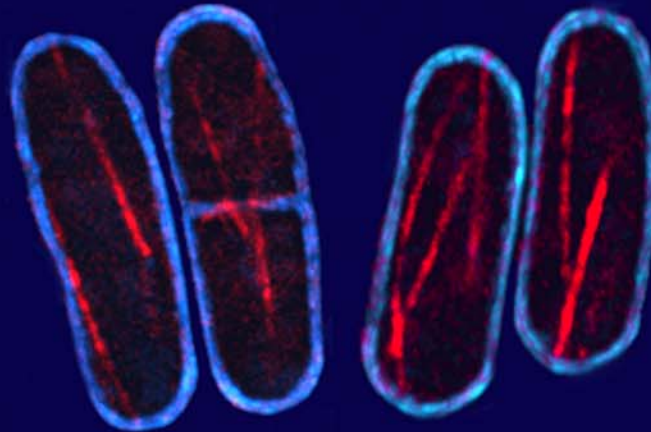




Universidad de Salamanca

Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Microbiología Bioquímica  
(USAL/CSIC)



**Caracterización de las proteínas  
Mtl2p y Wsc1p, como posibles sensores en la pared  
celular de *Schizosaccharomyces pombe***

Sandra Cruz Quintana  
2010

Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Microbiología Bioquímica  
(USAL/CSIC)

---



**VNiVERSiDAD  
D SALAMANCA**

**TESIS DOCTORAL**

---

Caracterización de las proteínas Mtl2p y  
Wsc1p, como posibles sensores en la pared  
celular de *Schizosaccharomyces pombe*

**Sandra Margarita Cruz Quintana  
Salamanca, 2010**

UNIVERSIDAD DE SALAMANCA

---

Departamento de Microbiología y Genética  
Instituto de Microbiología Bioquímica  
(USAL/CSIC)

**Caracterización de las proteínas Mtl2p y  
Wsc1p, como posibles sensores en la pared  
celular de *Schizosaccharomyces pombe***

Memoria presentada por **Sandra Margarita Cruz  
Quintana** para optar al grado de Doctor en Biología

**Salamanca, Septiembre 2010**

**DR. ÁNGEL DOMÍNGUEZ OLAVARRI**, CATEDRÁTICO DE  
MICROBIOLOGÍA Y DIRECTOR DEL DEPARTAMENTO DE  
MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

**CERTIFICA:**

Que la memoria titulada “**Caracterización de las proteínas Mtl2p y Wsc1p, como posibles sensores en la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe***”, presentada por la licenciada **Sandra Margarita Cruz Quintana**, para optar al Grado de **Doctor en Biología**, ha sido realizada bajo la dirección de la Dra. Yolanda Sánchez Martín en el Instituto de Microbiología Bioquímica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca a \_\_\_ de Septiembre de 2010.

Fdo. Dr. Ángel Domínguez Olavarri



**DRA. YOLANDA SÁNCHEZ MARTÍN**, PROFESORA TITULAR DEL  
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y GENÉTICA DE LA  
UNIVERSIDAD DE SALAMANCA,

**CERTIFICA:**

Que la licenciada **Sandra Margarita Cruz Quintana** ha realizado el trabajo titulado "**Caracterización de las proteínas Mtl2p y Wsc1p, como posibles sensores en la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe***", bajo su dirección, en el Instituto de Microbiología Bioquímica, centro mixto de la Universidad de Salamanca (Departamento de Microbiología y Genética) y el Consejo Superior de Investigaciones Científicas.

Y para autorizar su presentación y evaluación por el tribunal correspondiente, firmo el presente certificado en Salamanca a \_\_\_\_ de Septiembre de 2010.

Fdo. Dra. Yolanda Sánchez Martín

## AGRADECIMIENTOS

Especialmente a la Dra. Yolanda Sánchez, por tener tanta paciencia y comprensión conmigo y haberme acompañado en los buenos y malos momentos en este tiempo, además de todo lo que me ha enseñado.

A mis compañeras de laboratorio, sin Patricia no se que hubiera sido de mi, gracias por ayudarme y enseñarme siempre que lo necesité (que fueron muchas veces). A Sofía, Félix, Virginia, gracias por su alegría y amistad. Al resto del 231, Héner, Mohammad, Nagore, Cristina, etc, por hacerme siempre sentir en familia.

Gracias a todos los miembros del IMB, por hacer que mi trabajo fuese mucho más fácil y por estar siempre dispuestos a echar una mano si hacía falta. Sobre todo a los del grupo de pared, voy a extrañar los seminarios de los lunes, fundamentalmente por su compañía porque dar un seminario era una tortura psicológica. A Diana, Yaqui, Alberto, Carlos, Sergio, Pedro, Toñi, Mario, Miguel, Raúl, Javi, Belén, Laura, en fin, a todos muchísimas gracias.

A mi familia salmantina, Rosa, Pepe y Blanca, que tanto cuidaron de mi al igual que Melba y Jaime. A Dunia, mi pinareña favorita, siempre serás una “hermana” para mi, a todos mis amigos (Isac, Yaíma, Fany, Nicsa, Sergio, Jorge, Yordanis, Pedro) que me ayudaron mucho a hacer este tiempo más llevadero y divertido.

A mis compañeros de la Universidad de Sancti Spíritus, especialmente a los de la SUM de La Sierpe por cubrirme la retaguardia para poder hacer el doctorado.

A mi gran amiga Cacha, sin su ayuda no hubiera podido venir a España y desde lejos siempre ha estado pendiente de mi.

Gracias especialmente a mi familia, a mis padres, a mi hermana (Oscarito incluido), a Julio César, a mi esposo y a lo más bello de mi vida, mis hijos Patricia y Pedrito, sin el apoyo incondicional de todos ellos no sería lo que soy hoy.

## ABREVIATURAS

<b>aa</b>	Aminoácido/s
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosina 5'-trifosfato
<b>BSA</b>	Seroalbúmina bovina
<b>BPB</b>	Azul de bromofenol
<b>CF</b>	Calcoflúor
<b>Csp</b>	Casposfungina (Cancidas)
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>DTT</b>	Ditioeritritol
<b>EDTA</b>	Ácido etilén diamino tetra-acético
<b>GAP</b>	Proteína activadora de la actividad GTPásica ( <i>GTPase Activating Protein</i> )
<b>GDI</b>	Inhibidor de la disociación de GDP ( <i>GDP Dissociation Inhibitor</i> )
<b>GDP</b>	Guanina 5'-difosfato
<b>GEF</b>	Factor intercambiador de nucleótidos de guanina ( <i>Guanine Exchange Factor</i> )
<b>GFP</b>	Proteína verde fluorescente ( <i>Green Fluorescent Protein</i> )
<b>GS</b>	Glucán sintasa
<b>GTP</b>	Guanina 5'-trifosfato
<b>HA</b>	Epítipo procedente de la hemaglutinina del virus humano de la gripe
<b>MAP</b>	Proteína activada por mitógeno
<b>MAPK</b>	Quinasa activada por mitógeno
<b>MM</b>	Medio mínimo para <i>S. pombe</i>
<b>MTs</b>	Microtúbulos
<b>NETO</b>	Comienzo del crecimiento por el polo celular nuevo ( <i>New End Take Off</i> )
<b>OETO</b>	Comienzo del crecimiento por el polo celular antiguo ( <i>Old End Take Off</i> )
<b>ORF</b>	Fase de lectura abierta
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PKC</b>	Proteína Quinasa C
<b>PMSF</b>	Fluoruro de Ortometil Fenil Sulfonilo

<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato Sódico
<b>TBST</b>	Tampón Tris-salino con <i>Tween-20</i>
<b>TCA</b>	Ácido Tricloroacético
<b>T</b>	Tiamina
<b>UDP</b>	Uridina 5'-difosfato
<b>wt</b>	Estirpe silvestre
<b>YES</b>	Medio rico para <i>S. pombe</i>

# ***ÍNDICE***

**PÁGINA    CONTENIDO**

03	<b>INTRODUCCIÓN</b>
03	<b>1. CICLO DE VIDA Y MORFOGÉNESIS DE <i>S. pombe</i></b>
05	<b>1.1 Ciclo de vida de <i>S. pombe</i></b>
05	<b>1.2 Ciclo celular de <i>S. pombe</i></b>
07	<b>1.3 Morfología y regulación de la polaridad celular por el citoesqueleto de microtúbulos y de actina</b>
07	1.3.1 El citoesqueleto de microtúbulos
08	1.3.2 El citoesqueleto de actina
10	<b>2. LA PARED CELULAR DE <i>S. pombe</i></b>
10	<b>2.1 Arquitectura y composición de la pared celular de <i>S. pombe</i></b>
11	2.1.1 $\beta$ -glucano
11	2.1.1.1 $\beta(1,3)$ -glucano lineal
11	2.1.1.2 $\beta(1,3)$ -glucano ramificado
11	2.1.1.3 $\beta(1,6)$ -glucano
12	2.1.2 $\alpha(1,3)$ -glucano
13	2.1.3 Galactomanano y galactomanoproteínas
13	2.1.4 Quitina
13	2.1.5 Ensamblaje de la pared celular de <i>S. pombe</i>
14	<b>2.2 Biosíntesis y degradación de los principales polímeros de la pared</b>
14	2.2.1 Síntesis de $\beta(1,3)$ -glucano
15	2.2.1.1 Las subunidades catalíticas
16	2.2.1.2 La subunidad reguladora: Rho1p
17	2.2.2 Síntesis de $\beta(1,6)$ -glucano
18	2.2.3 Síntesis de $\alpha$ -glucano
18	2.2.4 Síntesis de galactomanano
19	2.2.5 Glucanosil-transferasas, $\alpha$ y $\beta$ - glucanasas
21	<b>3. DINÁMICA Y REGULACIÓN DE LA PARED CELULAR DE <i>S. pombe</i></b>
21	<b>3.1 Regulación de la biosíntesis de <math>\beta(1,3)</math>-glucano</b>
21	3.1.1 La GTPasa Rho1p

22	3.1.1.1 Los reguladores de la GTPasa Rho1p
24	3.1.1.2 Los efectores de la GTPasa Rho1p
25	<b>3.2 Regulación de la biosíntesis de <math>\alpha(1,3)</math>-glucano</b>
26	<b>3.3 Papel de Cdc42p, Rho3p y Rho4p en la estructura y remodelación de la pared celular</b>
26	3.3.1 Cdc42p
27	3.3.2 Rho3p y Rho4p
27	3.3.3 Rho5p
27	<b>4. LA RUTA DE MAPK Pmk1p Y EL MANTENIMIENTO DE LA INTEGRIDAD CELULAR EN <i>S. pombe</i></b>
27	<b>4.1 Composición de la ruta de MAPK liderada por Pmk1p</b>
28	<b>4.2 Activación de la ruta de integridad en <i>S.pombe</i></b>
30	<b>4.3 La ruta PKC de integridad en <i>S. cerevisiae</i></b>
31	<b>4.4 Las proteínas “sensoras” y la ruta de integridad en <i>S. cerevisiae</i></b>
37	<b>OBJETIVOS</b>
41	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>
41	<b>1. MICROORGANISMOS UTILIZADOS</b>
42	<b>2. MEDIOS DE CULTIVO</b>
42	2.1 Medios de cultivo para <i>S. pombe</i>
44	2.2 Medios de cultivo para <i>E. coli</i>
44	<b>3. CONDICIONES Y ESTIMACIÓN DEL CRECIMIENTO</b>
44	3.1 Condiciones de crecimiento para <i>S. pombe</i>
45	3.2 Condiciones de crecimiento para <i>E. coli</i>
45	<b>4. TÉCNICAS DE CLONACIÓN MOLECULAR</b>
45	4.1 Obtención de ADN
45	4.2 Tratamientos enzimáticos del ADN
45	4.3 Electroforesis del ADN en geles de agarosa
46	4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)
46	4.5 Secuenciación de ácidos nucleicos
48	4.6 Mutagénesis dirigida
48	4.7 Gap repair

49	<b>4.8 Vectores utilizados</b>
49	4.8.1 Vectores de <i>E. coli</i>
50	4.8.2 Vectores de levadura
51	4.8.3 Vectores construidos en este trabajo
54	<b>4.9 Sobreexpresión de <i>mtl2</i><sup>+</sup> y <i>wsc1</i><sup>+</sup></b>
54	<b>4.10 Delección de <i>mtl2</i><sup>+</sup> y <i>wsc1</i><sup>+</sup></b>
54	4.10.1 Cosntrucción del caste de delección <i>mtl2::kanMX6</i>
54	4.10.2 Cosntrucción del caste de delección <i>wsc1::kanMX6</i>
55	<b>4.11 Construcción del apagado <i>P81nmt1-mtl2</i><sup>+</sup> <i>wsc1</i><math>\Delta</math></b>
55	<b>4.12 Transformación de <i>E. coli</i></b>
55	<b>4.13 Transformación de <i>S. pombe</i></b>
56	<b>5. MÉTODOS GENÉTICOS</b>
56	<b>5.1 Conjugación y obtención de diploides</b>
57	<b>5.2 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación</b>
57	<b>5.3 Aislamiento de ascosporas al azar</b>
58	<b>5.4 Construcción de dobles mutantes y cepas marcadas con GFP</b>
58	<b>6. TÉCNICAS MICROSCÓPICAS</b>
58	<b>6.1 Microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (Nomarski)</b>
58	<b>6.2 Microscopía de fluorescencia</b>
58	6.2.1 Fluorescencia directa con GFP
59	6.2.2 Tinción con calcoflúor
59	<b>7. DETECCIÓN DE <i>Mtl2</i>pHA y <i>Wsc1</i>pHA</b>
60	<b>7.1 Detección de <i>Mtl2</i>pHA</b>
60	<b>7.2 Detección de <i>Wsc1</i>pHA</b>
60	<b>8. ENSAYO DE UNIÓN A ROTEQUINA</b>
61	<b>8.1 Producción de Rotequina</b>
62	<b>8.2 Obtención de extractos celulares</b>
62	<b>8.3 Ensayo de unión</b>
62	<b>8.4 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas</b>
63	<b>8.5 Inmunodetección de proteínas</b>



63	<b>9. VALORACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA <math>\beta(1,3)</math>-GLUCÁN SINTASA</b>
63	<b>9.1 Obtención de extractos enzimáticos</b>
64	<b>9.2 Ensayo enzimático</b>
64	<b>10. FRACCIONAMIENTO DE LOS POLÍMEROS DE LA PARED CELULAR</b>
64	<b>10.1 Marcaje radiactivo de las células</b>
65	<b>10.2 Extracción de las paredes</b>
65	<b>10.3 Digestiones enzimáticas de las paredes</b>
65	<b>10.4 Filtrado de las muestras</b>
66	<b>11. ENSAYO DE DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE PMK1P BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS</b>
67	<b>12. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO DE LOS DATOS</b>
71	<b>RESULTADOS</b>
71	<b>1. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES <i>mtl2</i><sup>+</sup> y <i>wsc1</i><sup>+</sup></b>
71	<b>1.1 Características de las proteínas Mtl2p y Wsc1p</b>
71	1.1.1 <i>mtl2</i> <sup>+</sup>
72	1.1.2 <i>wsc1</i> <sup>+</sup>
74	<b>2. OBTENCIÓN Y ANÁLISIS DE LOS MUTANTES NULOS <i>mtl2</i><math>\Delta</math> y <i>wsc1</i><math>\Delta</math></b>
74	<b>2.1 Obtención de los mutantes nulos <i>mtl2</i><math>\Delta</math> y <i>wsc1</i><math>\Delta</math></b>
74	2.1.1 Obtención del mutante nulo <i>mtl2</i> $\Delta$
75	2.1.2 Obtención del mutante nulo <i>wsc1</i> $\Delta$
76	<b>2.2 Análisis de los mutantes nulos <i>mtl2</i><math>\Delta</math> y <i>wsc1</i><math>\Delta</math></b>
76	2.2.1 Crecimiento de las cepas <i>mtl2</i> $\Delta$ y <i>wsc1</i> $\Delta$ en distintas condiciones
77	2.2.2 Los mutantes nulos <i>mtl2</i> $\Delta$ y <i>wsc1</i> $\Delta$ presentan defectos en la integridad celular
79	2.2.3 Los mutantes <i>mtl2</i> $\Delta$ y <i>wsc1</i> $\Delta$ son sensibles a antifúngicos
81	2.2.4 Los mutantes <i>mtl2</i> $\Delta$ y <i>wsc1</i> $\Delta$ son sensibles a distintos tipos de estrés
81	2.2.5 El mutante <i>mtl2</i> $\Delta$ presenta defectos en la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa y en el contenido de $\beta$ -glucano de la pared celular
83	<b>3. EL CICLO SEXUAL SE DESARROLLA NORMALMENTE EN LOS MUTANTES NULOS <i>mtl2</i><math>\Delta</math> y <i>wsc1</i><math>\Delta</math></b>
84	<b>4. LA DELECIÓN SIMULTÁNEA DE <i>mtl2</i><math>\Delta</math> y <i>wsc1</i><math>\Delta</math> ES LETAL</b>
84	<b>4.1 Niveles muy bajos de Mtl2p y Wsc1p provocan la lisis de las células</b>
86	<b>5. CLONACIÓN DE <i>mtl2</i><sup>+</sup> y <i>wsc1</i><sup>+</sup></b>

86	5.1 Clonación de <i>mtl2</i> <sup>+</sup>
87	5.2 Clonación de <i>wsc1</i> <sup>+</sup>
88	<b>6. Mtl2p y Wsc1p SE LOCALIZAN EN LA SUPERFICIE CELULAR</b>
88	6.1 Construcción de las cepas Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP
90	6.2 Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP se localizan en la superficie celular
90	6.3 La localización de Wsc1p depende del crecimiento polarizado
91	6.4 Wsc1p-GFP no se localiza correctamente en el mutante <i>mtl2Δ</i>
92	6.5 La localización polarizada de Wsc1p depende del citoesqueleto de actina
93	6.6 La localización de Mtl2p y Wsc1p no depende del transporte de microtúbulos
	<b>7. LA ACTIVACIÓN DE Rho1p SUPRIME EL FENOTIPO DE SENSIBILIDAD A CASPOFUNGINA DE LOS MUTANTES <i>mtl2Δ</i> Y <i>wsc1Δ</i> Y RESCATA EL CRECIMIENTO DE LAS CÉLULAS CON BAJOS NIVELES DE MTL2P Y WSC1P</b>
95	
95	7.1 Rho1p y sus GEFs Rgf1p y Rgf2p suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante <i>mtl2Δ</i>
97	7.2 <i>pck1</i> <sup>+</sup> suprime el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante <i>mtl2Δ</i>
98	7.3 La sobreexpresión de las proteínas de la familia de las β-glucán sintasas suprimen parcialmente el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del
98	7.4 La sobreexpresión de Wsc1p suprime el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante <i>mtl2Δ</i>
99	7.5 La sobreexpresión de <i>rho1</i> <sup>+</sup> y <i>rgf1</i> <sup>+</sup> suprimen parcialmente el fenotipo de sensibilidad a caspofungina del mutante <i>wsc1Δ</i>
100	7.6 Solo la sobreexpresión de <i>mtl2</i> <sup>+</sup> suprime parcialmente el fenotipo de sensibilidad a caspofungina del mutante <i>rgf1Δ</i>
101	7.7 Un aumento de la expresión de <i>rho1</i> <sup>+</sup> y <i>rgf1</i> <sup>+</sup> rescata el fenotipo de muerte celular que se produce en ausencia de Mtl2p y Wsc1p
102	7.8 Mtl2p y Wsc1p participan en la activación de Rho1p en células estresadas con caspofungina por largos períodos de tiempo
105	<b>8. RELACIÓN FUNCIONAL ENTRE Wsc1p, Mtl2p Y Rgf1p</b>
105	8.1 Estudios de co-localización entre Wsc1p, Mtl2p y Rgf1p
105	8.2 Estudio de la localización de Rgf1p en los mutantes <i>mtl2Δ</i> y <i>wsc1Δ</i>
106	8.3 La delección simultánea de los genes <i>mtl2</i> <sup>+</sup> y <i>rgf1</i> <sup>+</sup> y de los genes <i>wsc1</i> <sup>+</sup> y <i>rgf1</i> <sup>+</sup> es letal
107	8.4 La sobreexpresión de Rgf1p no es letal en el mutante <i>wsc1Δ</i>
108	<b>9. LA SOBREENPRESIÓN DE <i>wsc1</i><sup>+</sup> PERO NO DE <i>mtl2</i><sup>+</sup> PRODUCE MORFOLOGÍA ABERRANTE Y AUMENTA LA SÍNTESIS DE β-GLUCANO</b>

108	9.1 La sobreexpresión de <i>mtl2</i> <sup>+</sup> es letal
109	9.2 La sobreexpresión de <i>wsc1</i> <sup>+</sup> es letal
110	9.3 La sobreexpresión de <i>wsc1</i> <sup>+</sup> aumenta la síntesis de $\alpha$ y de $\beta$ -glucano
111	<b>10. RELACIÓN DE Mtl2p y Wsc1p CON LA CASCADA DE INTEGRIDAD CELULAR LIDERADA POR Pmk1p</b>
112	10.1 Los mutantes <i>mtl2</i> $\Delta$ y <i>wsc1</i> $\Delta$ no presentan el fenotipo vic (viable en presencia de inmunosupresor y de iones cloruro)
115	10.2 La activación de Pmk1p que se produce en respuesta a estrés osmótico o a estrés por daños en la pared, no depende de Mtl2p ni de Wsc1p
117	<b>11. Relación de Mtl2p y Wsc1p con la cascada de respuesta a estrés</b>
121	<b>DISCUSIÓN</b>
122	1. Mtl2p y Wsc1p participan en la regulación de la integridad celular a través de Rho1p
123	2. Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP se localizan en la superficie celular
124	3. Wsc1p está involucrada en la regulación de la biosíntesis de $\beta$ (1,3)-glucano
126	4. Mtl2p actúa en paralelo con respecto a Wsc1p regulando la integridad celular
126	5. Mtl2p y Wsc1p no participan en la señalización en respuesta a estrés osmótico y daño en la pared celular a través de la ruta Pmk1p
131	<b>CONCLUSIONES</b>
135	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>

# *INTRODUCCIÓN*

.....La pared celular fúngica es una estructura esencial para el mantenimiento de la morfología celular y protege a las células frente a las condiciones adversas del medio externo (Durán y Pérez, 2004; Latgé, 2007; Levin, 2005). Además del interés que presenta el estudio de la síntesis y regulación de la pared celular como modelo morfogénico, no hay que olvidar que la pared celular es una estructura esencial para los hongos patógenos y que se encuentra ausente en las células de eucariotas superiores (mamíferos, etc.). El conocimiento en profundidad de esta estructura es importante para identificar nuevas dianas necesarias para el desarrollo de compuestos antifúngicos. De hecho, uno de los antifúngicos más prometedores es el acetato de caspofungina (CANCIDAS<sup>TM</sup>), un inhibidor de la biosíntesis de  $\beta$ -glucano que actualmente se está utilizando para el tratamiento de aspergilosis invasivas y otras infecciones fúngicas (Sucher et al., 2009; Wagner et al., 2006).

Nuestro objetivo es estudiar como se regula la biosíntesis de la pared celular tanto en condiciones normales de crecimiento como en condiciones que alteran su estructura y que disparan una respuesta de adaptación importante para la supervivencia de la célula. Para ello estudiamos el papel de la GTPasa Rho1p en la levadura *Schizosaccharomyces pombe*. Rho1p es una pieza clave tanto en la biosíntesis de la pared celular como en la construcción del citoesqueleto y en la secreción polarizada. También nos interesa estudiar el papel de los GEFs (guanine nucleotide exchange factors) de Rho1p que son los responsables de su activación en un determinado momento del ciclo celular y/o en un lugar específico de la

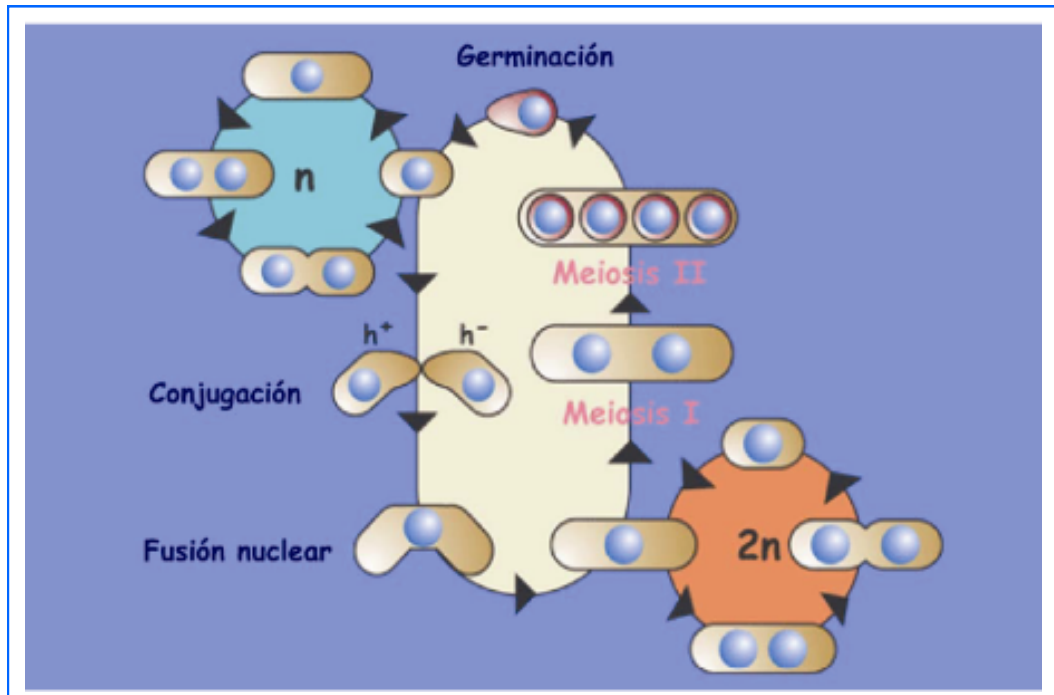


**Figura 1.** Fotografía al microscopio electrónico de barrido de células de la levadura silvestre de *S. pombe*.

célula.

## 1. Ciclo de vida y morfogénesis en *Schizosaccharomyces pombe*

La levadura *Schizosaccharomyces pombe* fue descrita por primera vez en 1983 por P. Lindner. El nombre genérico hace referencia a su semejanza con la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, mientras que el epíteto específico designa el nombre local de la cerveza elaborada con esta levadura. Años después A. Ostewalder aisló de un jugo de uva la estirpe homotática  $h^{90}$ , que lleva este nombre porque en medio pobre el 90% de las células son capaces de conjugarse y formar esporas. En sucesivas divisiones mitóticas de la estirpe  $h^{90}$ , una célula de un tipo sexual determinado puede cambiar al tipo sexual opuesto, lo que conduce a una población que en ausencia de nutrientes conjugan y acaban esporulando. De la estirpe  $h^{90}$  se aislaron las cepas heterotáticas 972  $h^+$  y 975  $h^-$  y de ellas derivan todas las cepas



**Figura 2: Ciclo de vida de *S. pombe*.** Ciclo vegetativo haploide (señalado en verde) y diploide (señalado en naranja) de *S. pombe*. Las células vegetativas se dividen por fisión transversal dando lugar a dos células hijas de igual tamaño. Cuando las condiciones del medio no son óptimas *S. pombe* cambia a un ciclo sexual en el que se produce la formación de un cigoto diploide que posteriormente sufrirá meiosis y esporulación, dando lugar a 4 ascosporas haploides que quedan incluidas en el interior de un asca.

empleadas actualmente en el laboratorio (Leupold, 1950).

En los últimos 25 años *S. pombe* se ha convertido en un organismo atractivo para el estudio de multitud de procesos biológicos sobre todo los que conciernen a la maquinaria de crecimiento y división celular (Armstrong et al., 2007; Nurse, 1994). *S. pombe* es fácil de manipular en el laboratorio, no es patógeno, presenta un ciclo de vida y un ciclo sexual de corta duración y es susceptible de análisis genético clásico y molecular debido a la secuenciación de su genoma (Wood et al., 2002), ([www.sanger.ac.uk/Projects/S\\_pombe](http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe)).

*S. pombe* pertenece a los ascomicetos al igual que *S. cerevisiae*, sin embargo los estudios de comparación de las secuencias de

proteínas ortólogas de diversos grupos de hongos sugieren que *S. pombe* divergió de la línea troncal de los ascomicetos hace 1.144 millones de años (Heckman et al., 2001; Sipiczki, 1995). Esta divergencia evolutiva entre *S. pombe* y *S. cerevisiae* se refleja en sus ciclos de vida y en la regulación de su ciclo celular.

*S. pombe* es un microorganismo ideal para la realización de estudios de morfogénesis y polaridad, ya que su forma, tamaño y su ciclo de división celular son extremadamente reproducibles en el laboratorio, además se pueden obtener mutantes con morfologías aberrantes sin pérdida de la viabilidad (Hayles and Nurse, 2001).

## 1.1 Ciclo de vida de *Schizosaccharomyces pombe*

Las células de *S. pombe* presentan una forma cilíndrica y al nacer tienen un tamaño aproximado de 3-4  $\mu\text{m}$  de diámetro y 7-8  $\mu\text{m}$  de longitud. Durante el crecimiento, las células mantienen un diámetro constante y aumentan en longitud hasta alcanzar 12-15  $\mu\text{m}$ , que es el tamaño necesario para dividirse. La reproducción vegetativa se produce por fisión transversal, mediante la formación de un septo perpendicular al eje mayor de la célula que tras la citocinesis se disuelve dando lugar a dos células hijas de idéntico tamaño (**figura 2, círculo verde**).

Las cepas de *S. pombe* utilizadas en el laboratorio se pueden mantener de forma continua en estado haploide. En medio rico o medio mínimo el tiempo de generación varía entre 2 y 4 horas.

El ciclo sexual de *S. pombe* se representa en la **figura 2**. Las células haploides pertenecen a dos tipos sexuales diferentes  $h^+$  y  $h^-$  (Leupold, 1950). Si cultivamos células de diferente tipo sexual en un medio carente de nitrógeno o nutrientes se producen una serie de cambios morfogénicos que conducen al proceso de conjugación. Éste empieza con la formación de una proyección denominada “*shmoo*” en un extremo de cada célula hasta que ambas se ponen en contacto y se fusionan formándose un cigoto (Egel, 1994). Los cigotos son células diploides inestables y en medios pobres suelen sufrir inmediatamente un proceso de meiosis que conduce a la formación de cuatro núcleos haploides, cada uno de los cuales quedará incluido en el interior de una espora haploide y éstas a su

vez en el interior de un asca zigótica.

Cada tétrada contiene dos esporas de cada tipo sexual. La separación de estas 4 ascosporas mediante micromanipulación (método llamado “análisis de tétradas”) es la base del análisis genético de este organismo. En un momento determinado la pared del asca se rompe y libera las esporas haploides que permanecerán latentes hasta que encuentren condiciones favorables, entonces germinan reiniciando el ciclo (**figura 2**). En el laboratorio y bajo determinadas condiciones, pueden mantenerse células diploides en cultivo a partir de cigotos. Estos individuos diploides pueden entonces entrar en sucesivos ciclos mitóticos diploides (Egel y Egel-Mitani, 1974) (**figura 2, círculo naranja**). Las células diploides de *S. pombe* (de 11-14  $\mu\text{m}$  de longitud al formarse y 20-25  $\mu\text{m}$  antes de la división) son muy inestables y tienden a esporular rápidamente si entran en fase estacionaria o si escasean los nutrientes en el medio formándose un asca azigótica con cuatro ascosporas haploides (**figura 2**).

En la naturaleza las células de *S. pombe* pueden crecer como pseudohifas, que son cadenas de células que aunque han completado la citocinesis permanecen unidas. Este podría ser un mecanismo para buscar nutrientes de un modo más eficaz (Amoah-Buahin et al., 2005).

## 1.2 Ciclo celular de *Schizosaccharomyces pombe*

El ciclo celular de *S. pombe* se caracteriza por presentar una fase G2 muy amplia que abarca aproximadamente el 70% del ciclo. Cuando la célula ha duplicado su

material genético y ha alcanzado un tamaño mínimo determinado, sufre mitosis y sus núcleos se separan. En este momento comienza a formarse el septo de división, mientras las células, aún unidas, entran en una fase G1 muy corta; posteriormente vuelven a duplicar su material genético (fase S) coincidiendo con la septación, de forma que las dos células hijas recién separadas emergen en la fase G2 de su ciclo celular (Chang and Verde, 2004).

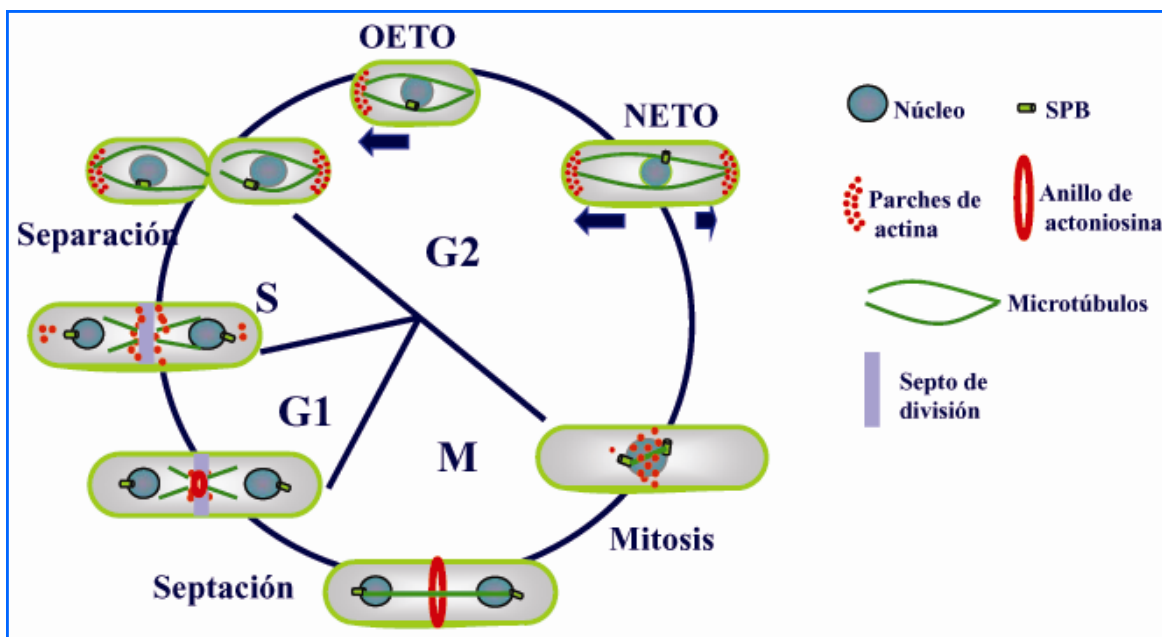
Las células de *S. pombe* sufren tres transiciones morfológicas importantes durante su ciclo de vida vegetativo (figura 3):

Crecimiento monopolar: tras la citocinesis, en el momento denominado

OETO (*Old End Take Off*), las dos células hijas idénticas en tamaño inician un crecimiento polarizado, alargándose sólo por el polo que ya existía en la célula madre (“polo antiguo”). Este patrón de crecimiento se mantiene durante los primeros momentos de la fase G2.

Crecimiento bipolar: también llamado NETO (*New End Take Off*), en este momento se produce una transición desde el crecimiento monopolar a un crecimiento bipolar, y el polo creado en la división anterior (“polo nuevo”) también comienza a alargarse (Mitchison and Nurse, 1985).

Separación celular: finalmente, cuando la célula alcanza su tamaño máximo, cesa el alargamiento por los polos y se produce la



**Figura 3** : Ciclo morfológico y ciclo celular de *S. pombe*. La fase G1 del ciclo celular de *S. pombe* es muy corta y tiene lugar cuando las células hijas aún no se han separado, al igual que la fase S, que coincide aproximadamente con el momento de la separación. A lo largo del ciclo celular se produce una reorganización del citoesqueleto de actina y microtúbulos (MTs). Los parches de actina se localizan en los polos en crecimiento durante la interfase y en la región del septo durante la división celular, junto con el anillo de actinosina. Los MTs forman haces que se distribuyen a lo largo de la célula en interfase. Durante la mitosis se forma el huso mitótico para la segregación cromosómica y posteriormente el huso se desensambla para formar el "post anafase array" durante la formación del septo y la contracción del anillo.



formación de un septo de división central y la posterior separación de las células hijas.

### 1.3 Morfología y regulación de la polaridad celular por el citoesqueleto de microtúbulos y de actina

En *S. pombe* la actina y los microtúbulos no son imprescindibles para el mantenimiento de la forma como sucede en células animales, probablemente debido a existencia del exoesqueleto de pared celular. Sin embargo, tanto la actina como los microtúbulos son esenciales para el crecimiento polarizado y tienen funciones reguladoras y estructurales durante el crecimiento activo. Cuando se altera el citoesqueleto de actina las células pierden la polaridad y se vuelven redondeadas, revisado por (Gachet et al., 2004). Mientras que cuando los microtúbulos están afectados las células pierden su capacidad para crecer por los polos y se forman células curvadas y ramificadas (Hagan, 1998).

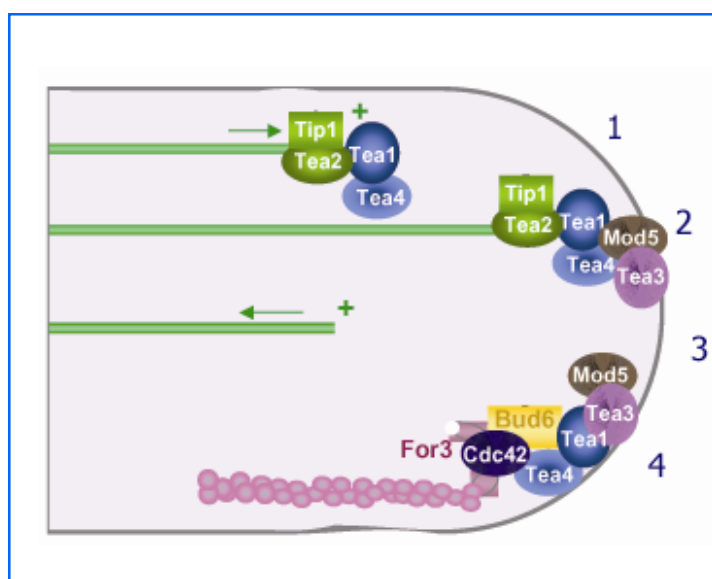
La regulación de los citoesqueletos de actina y microtúbulos es esencial para la

célula y está perfectamente coordinada y controlada a lo largo del ciclo celular.

#### 1.3.1 El citoesqueleto de microtúbulos

Los microtúbulos son cilindros huecos de aproximadamente 25 nm compuestos por dímeros de  $\alpha/\beta$  tubulina. Normalmente se polimerizan desde un Centro Organizador de Microtúbulos (MTOC) y tienen un extremo positivo (+) y uno negativo (-) con diferentes características.

Los microtúbulos interfásicos se extienden a lo largo del eje longitudinal de la célula, formando una cesta alrededor del núcleo (revisado por Sawin and Tran, 2006). El extremo positivo del microtúbulo se encuentra situado próximo al polo y el negativo hacia la zona media de la célula. Normalmente cada haz de microtúbulos individual crece hasta el polo celular y una vez que lo alcanza, se produce un desensamblaje que lo hace retroceder hacia la zona media, volviendo a crecer después hacia el polo de nuevo (Drummond and Cross, 2000; Tran et al., 2001).



**Figura 4 : Activación del crecimiento en el polo nuevo.** 1) Tea1p y Tea4p se encuentran ancladas a los extremos + de los microtúbulos a través de Tip1p-Tea2p y Mal3p (no mostrada). 2) Tea1p y Tea4p se anclan en los polos a través de Mod5p y Tea3p y el microtúbulo se retrae. Tea1p-Tea4p se localizan en ambos polos celulares durante el crecimiento mono- y bipolar. 3 y 4) al activarse NETO Tea4p recluta a For3p-Bud6p-Cdc42p en el polo nuevo y se inicia la nucleación de cables de actina (Adaptado de (Martín and Chang, 2005).

Los microtúbulos sólo se retraen después de alcanzar el polo celular y no hacen cuando alcanzan los lados de la célula (Brunner and Nurse, 2000). Esta dinámica podría determinar la posición del núcleo, produciendo fuerzas de empuje frecuentes y transitorias desde los polos celulares sobre el núcleo. Este sería un mecanismo simple para explicar cómo las células sienten la posición de sus polos y centran el núcleo entre ellos (Tran et al., 2001).

Los microtúbulos son necesarios para determinar los puntos de crecimiento, probablemente debido a que transportan hasta ellos proteínas de polaridad como Tea1p, Tea4p y Tip1p que sirven para reconocer los polos y para marcar las zonas de crecimiento activo (revisado en Chang and Martín, 2009; Martín, 2009) (**figura. 4**). Uno de los marcadores de crecimiento mejor estudiados es Tea1p, esta proteína se localiza en ambos polos y es transportada hasta allí en los extremos (+) de los microtúbulos. Tea1p participa en la elección del segundo sitio de crecimiento o extremo nuevo, por ello los mutantes *tea1Δ* crecen sólo por uno de los polos (Mata and Nurse, 1997). Años más tarde, se caracterizó Tea4p como una proteína que se une a Tea1p y a la formina For3p. (Martín et al., 2005).

La localización del complejo Tea1p/Tea4p depende de las proteínas +TIP (Tip1p y Mal3p) y de la kinesina Tea2p, que lo sitúan en los extremos (+) de los microtúbulos, y de Mod5p y Tea3p, que lo anclan al cortex. Ya en el polo, Tea1p/Tea4p interaccionan directa o indirectamente con otras proteínas, hasta ahora han sido descritas For3p, Rga4p, Win1p y Dis2p, aunque probablemente participen otras

muchas (Álvarez-Tabarés et al., 2007; Martín et al., 2005; Tatebe et al., 2008; Tatebe et al., 2005 ). En primer lugar Tea1p/Tea4p se unen a la formina For3p reclutándola en el polo nuevo, lo que promueve la nucleación de los cables y parches de actina en ese polo. El complejo Tea1p/Tea4p también recluta a la kinasa Pom1p. Pom1p contribuye a la activación de la GTPasa Cdc42p (al menos en uno de los polos), lo que a su vez activa a For3p reforzando así el mecanismo de polarización (Martín et al., 2005; Martín et al., 2007; Rincón et al., 2009).

Una vez elegidos los lugares de crecimiento, los microtúbulos no son esenciales para el mantenimiento de la polaridad o para la correcta localización de los parches de actina (Pelham and Chang, 2001; Sawin and Nurse, 1998) Se ha observado que mutantes que presentan defectos en la organización de los microtúbulos todavía muestran un crecimiento polarizado, aunque presentan células curvadas o ramificadas, o con crecimiento monopolar.

### 1.3.2 El citoesqueleto de actina

Una vez establecidos los polos de crecimiento, la célula comienza a crecer gracias al citoesqueleto de actina, que dirige la secreción polarizada de la nueva membrana y las enzimas implicadas en la síntesis de la pared celular a las regiones por las que se está alargando.

El citoesqueleto de actina juega un papel muy importante en el mantenimiento de la morfología celular. En *S. pombe*, el mutante *cps8-118* afectado en el único gen

de la actina, *act1*<sup>+</sup>, presenta una morfología aberrante con células redondeadas, ramificadas, alargadas y con septos mal posicionados. Por otra parte, en muchos de los mutantes que presentan una morfología alterada, como los de *cdc42* o los mutantes *orb*, la actina se encuentra deslocalizada (Ishiguro and Kobayashi, 1996; Miller and I., 1994; Otilie et al., 1995; Rincón et al., 2009; Verde et al., 1995).

El citoesqueleto de actina en levaduras se organiza formando tres estructuras diferentes: parches de actina, cables de actina y el anillo contráctil de actomiosina.

Durante la interfase, los parches de actina se concentran en los sitios de crecimiento celular. Los cables corren a lo largo del eje longitudinal de la célula y normalmente acaban en los polos. En mitosis, la actina se reorganiza en un anillo central de actomiosina que se contrae durante la citocinesis. En este momento, los parches y los cables se concentran en la zona media y permanecen allí durante la formación del septo de división; revisado en Bathe and Chang, 2009; Pollard and Wu, 2010).

Los **parches** de actina se han usado habitualmente como marcadores de los sitios de crecimiento activo de la célula y se asume que funcionan en el crecimiento polarizado y en endocitosis. Los parches de actina contienen proteínas relacionadas con la organización de la actina, como los componentes del complejo Arp2/3, y parecen ser los sitios primarios de nucleación de actina en la célula en interfase (McCollum et al., 1996; Nolen and Pollard, 2008; Pelham and Chang, 2001). Recientemente, se ha descrito en *S. pombe* el mecanismo de

ensamblaje y desensamblaje de los parches de actina (Berro et al., 2010; Sirotkin et al., 2010).

Se cree que los **cables** de actina que se proyectan de los polos celulares participan directamente en el crecimiento polarizado (Kamasaki et al., 2005). Una de sus funciones es dirigir junto con las miosinas de tipo V, los movimientos de las vesículas secretoras que proporcionan membranas y componentes necesarios para la síntesis de la pared celular en los polos de crecimiento (Motegi et al., 2001; Mulvihill et al., 2006; Win et al., 2001).

En el ensamblaje de los cables de actina participan la formina For3p y la proteína de unión a actina, tropomiosina (Cdc8p) (Feierbach and Chang, 2001; Martín and Chang, 2006). La función de las forminas es nuclear y alargar filamentos lineales de actina. Sin embargo, en un mutante *for3Δ*, en el que no existen “aparentemente” cables de actina, las células aún mantienen cierto grado de crecimiento polarizado y son viables, aunque crecen lentamente y muchas de forma monopolar.

En células pre-mitóticas la proteína Mid1p se sitúa alrededor del núcleo y actúa reclutando a otras proteínas (miosinas, forminas, etc) lo que va a permitir el ensamblaje en el centro de la célula de un **anillo** de actina y miosina. En mitosis tardía, este anillo marca el sitio de formación del septo de pared celular, y se contrae cercano a la membrana y guiando el proceso de formación del septo (Bathe and Chang, 2009; Pollard and Wu, 2010).

Existe una estrecha relación funcional

entre el citoesqueleto de actina y el crecimiento polarizado, una de cuyas últimas consecuencias es la síntesis de la pared celular. Por ejemplo, en los experimentos de regeneración de protoplastos (células esféricas a las que se ha eliminado la pared), se ha visto que la formación de nuevo material de pared depende del citoesqueleto de actina (Osumi et al., 1989).

Otros factores que actúan en polaridad son las GTPasas de la familia Rho. Éstas regulan tanto la polimerización de la actina como su organización en todos los organismos estudiados (García et al., 2006b; Jaffe and Hall, 2005; Rincón et al., 2005). En *S. pombe*, al menos tres GTPasas de esta familia se han relacionado con el control de la polimerización y la localización del citoesqueleto de actina, son Cdc42p, Rho1p y Rho3p (este tema se abordará con mayor profundidad en los Apartados 3.2 y 3.4)

Durante las transiciones morfológicas comentadas hasta ahora, es esencial el mantenimiento de la integridad celular. Esto requiere que la secreción y el crecimiento polarizados estén perfectamente coordinados con la biosíntesis de la pared celular y que exista una estricta regulación de las rutas de biosíntesis y degradación de los polímeros que la forman; revisado en (Durán and Pérez, 2004; Fischer et al., 2008; Latgé, 2007; Lessage and Bussey, 2006; Levin, 2005b; Moseley and Goode, 2006; Pruyne et al., 2004).

## 2. La pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*

La pared celular fúngica es una matriz

glicoproteica externa a la membrana plasmática que protege a la célula y le permite interactuar con su entorno. En las levaduras y hongos la necesidad de mantener íntegra la pared celular Durante los cambios morfogénicos sufridos a lo largo de su ciclo vital hace que, necesariamente, la síntesis y degradación de dicha matriz estén reguladas y coordinadas con otros procesos celulares y con la maquinaria de control del ciclo celular.

La pared celular es necesaria para mantener la morfología típica de las células de *S. pombe* y la viabilidad celular ya que los protoplastos obtenidos mediante digestión enzimática de los polímeros de la pared celular se redondean y pierden rápidamente la viabilidad celular si no se mantienen en un medio estabilizado osmóticamente.

### 2.1 Arquitectura y composición de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*

La pared celular de los hongos está compuesta mayoritariamente por polisacáridos y glicoproteínas. Los principales polisacáridos que encontramos en las paredes fúngicas son  $\alpha$  y  $\beta$ -glucanos. Estos polímeros suelen ordenarse en cadenas lineales que se unen entre sí por puentes de hidrógeno formando fibrillas. También encontramos otros polímeros menos abundantes como quitina y manano, glucuromanano o galactomanano unido a proteínas.

En *S. pombe* el polisacárido mayoritario en la pared celular es el  $\beta$ -glucano, que constituye aproximadamente de un 50 a un 55% de los azúcares de la pared.

Encontramos además  $\alpha$ -glucano (del 28 al 32%) y galactomamano (del 9 al 14%) asociado a proteínas. En *S. pombe* no hay quitina en la pared celular de las células vegetativas aunque sí aparece en la pared celular de las esporas (Durán and Pérez, 2004).

Al microscopio electrónico la pared lateral de *S. pombe* presenta una estructura trilaminar, con dos capas externas densas a los electrones donde se localizan las glicoproteínas y una capa interna menos densa a los electrones compuesta principalmente por  $\alpha$  y  $\beta$ -glucanos (**figura 5**) (Horisberger and Rouvet-Vauthey, 1985). La ultraestructura del septo de división está también muy organizada y presenta una capa interna menos densa a los electrones denominada septo primario y dos capas más densas a los electrones a ambos lados del septo primario de composición similar a la pared lateral, denominada septo secundario (Sipiczki, 2007).

## 2. 1.1 $\beta$ -glucano

El  $\beta$ -glucano está formado por monómeros de D-glucosa unidos por enlaces

$\beta(1,3)$  o  $\beta(1,6)$ . Existen diferentes tipos de  $\beta$ -glucano:  $\beta(1,3)$ -glucano lineal,  $\beta(1,6)$ -glucano y  $\beta(1,3)$ -glucano con ramificaciones de  $\beta(1,6)$ -glucano, que es el más abundante (**figura 7**).

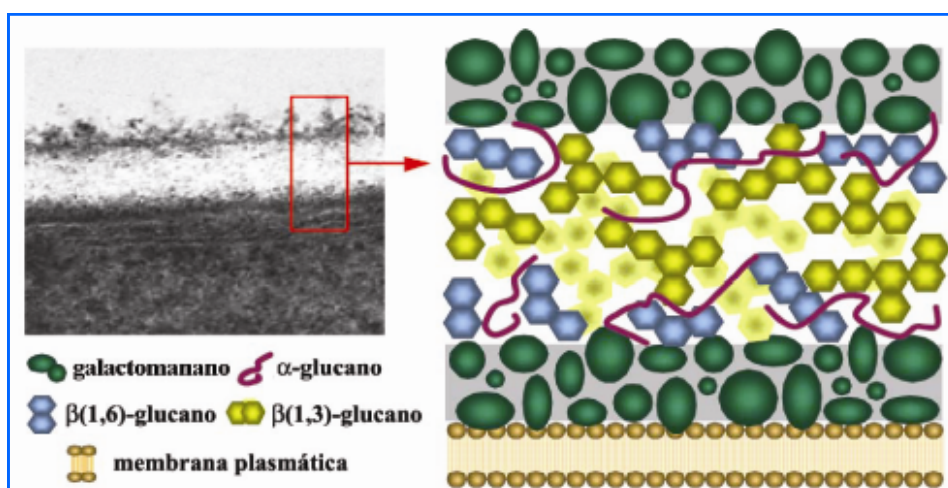
### 2.1.1.1 $\beta(1,3)$ -glucano lineal

Está compuesto por cadenas lineales de glucosa sin ramificaciones. Se localiza exclusivamente en el septo primario (**figura 6**).

### 2.1.1.2. $\beta(1,3)$ -glucano ramificado

Es el más abundante de todos los polisacáridos y está formado por cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\beta(1,3)$  y ramificadas en  $\beta(1,6)$ . Es el primer polisacárido en depositarse en la nueva pared en formación durante la regeneración de protoplastos y en torno a él se ensamblan el  $\alpha$ -glucano y el galactomanano. Se localiza por toda la pared celular, en el septo primario y en el septo secundario (Humbel et al., 2001; Osumi et al., 1998) (**figura 6**).

### 2.1.1.3 $\beta(1,6)$ -glucano



**Figura 5:** Estructura de la pared celular de *S. pombe*. La pared consta de tres capas. La capa intermedia, menos densa a los electrones, está formada por  $\alpha$  y  $\beta$  glucanos. Las capas más externas están formadas por galactomamano



El  $\beta(1,6)$ -glucano está formado por cadenas de glucosa unidas por enlaces  $\beta(1,6)$  y se encuentra muy ramificado, hasta un 43% de enlaces en  $\beta(1,3)$  (Sugawara et al., 2004). Anticuerpos anti  $\beta(1,6)$ -glucano sitúan este polímero en el septo secundario y en el resto de la pared celular lateral cerca de la capa más externa de galactomanano, pero no aparece en el septo primario (figura 6). También se ha detectado su presencia en el aparato de Golgi y en vesículas pequeñas situadas bajo la membrana plasmática (Humbel et al., 2001)

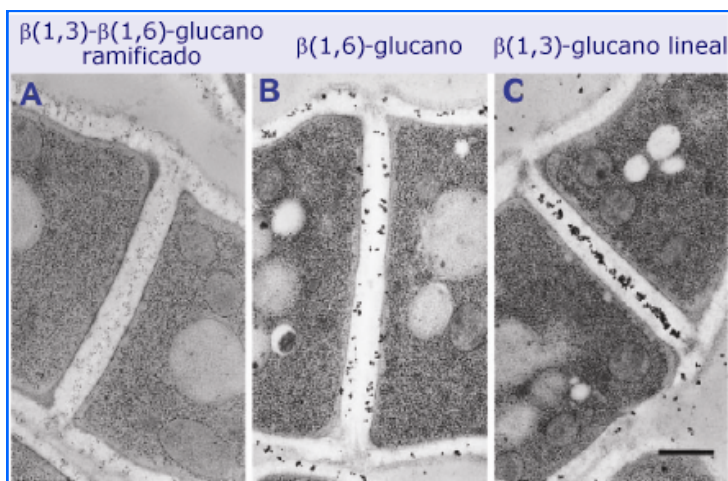
### 2.1.2 $\alpha(1,3)$ -glucano

El  $\alpha$ -glucano está presente en la pared celular de *S. pombe* y otros hongos dimórficos y filamentosos como *Histoplasma capsulatum*, *Paracoccidioides brasiliensis* y *Blastomyces dermatitidis* (Bobbitt et al., 1977; Bush et al., 1974; Sietsma and Wessels, 1977), aunque curiosamente se encuentra ausente en la pared celular de *S. cerevisiae*. Además, algunos organismos patógenos como *Cryptococcus neoformans* necesitan el  $\alpha$ -glucano para que se ancle la cápsula, que es un determinante de la virulencia (Doering,

2009; Reese and Doering, 2003).

En *S. pombe* las cadenas de  $\alpha$ -glucano están formadas por D-glucosa unida por enlaces  $\alpha(1,3)$  con un 7% de enlaces  $\alpha(1,4)$  (figura 7) (Manners and Meyer, 1977) y se distribuyen por toda la pared celular y en la región del septo, sobre todo en las regiones adyacentes a la membrana plasmática (Sugawara, 2003). En esporas, el  $\alpha$ -glucano es muy abundante y se han detectado dos tipos de polímeros, uno de ellos mayoritario con unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1,3)$  y un polímero que está formado por unidades de glucosa unidas por enlaces  $\alpha(1,4)$  y que se tiñe en presencia de yodo (García et al., 2006).

El  $\alpha$ -glucano es esencial para mantener la morfología celular. Durante la obtención de protoplastos, cuando se digiere la pared celular con distintos cócteles enzimáticos se observa que el tratamiento con  $\beta$ -glucanasas debilita la pared pero mantiene la forma y es solamente cuando se añaden  $\alpha$ -glucanasas cuando las células pierden la polaridad y se redondean (Alfa et al., 1993).



**Figura 6: Inmunolocalización de los distintos tipos de  $\beta$ -glucano de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*.** Se desarrollaron anticuerpos específicos contra  $\beta(1,3)$ - $\beta(1,6)$ -glucano ramificado (A),  $\beta(1,6)$ -glucano (B) y  $\beta(1,3)$ -glucano lineal (C), que se localizan como se muestra en las fotografías. Los anticuerpos se conjugaron con oro coloidal para detectarlos al microscopio electrónico de transmisión (Imágenes tomadas de Humbel et al., 2001).

Mediante inmunolocalización se ha detectado  $\alpha$ -glucano en toda la pared celular y en la región del septo sobre todo en las regiones adyacentes a la membrana plasmática (Sugawara, 2003).

### 2.1.3 Galactomanano y las galactomanoproteínas

El galactomanano está formado por cadenas cortas de D-manosa lineal unidas por enlaces  $\alpha(1,6)$  al que se unen cadenas laterales de manosa con uniones  $\alpha(1,2)$  (figura 7). En los extremos no reductores de estas cadenas a veces se encuentra un residuo de galactosa, aunque en ocasiones se ha encontrado galactosa en posición no terminal (Chappell et al., 1994; Horisberger et al., 1978; Ohashi and Takegawa, 2010).

El galactomanano se encuentra covalentemente unido a proteínas mediante enlaces O y N-glicosídicos (Gemmill and Trimble, 2004). Estas proteínas se secretan al espacio periplásmico y se localizan en la superficie externa de la pared y en la región cercana a la membrana plasmática, las regiones más densas a los electrones observadas al microscopio electrónico (figura 5) (Horisberger et al., 1978). La capa más externa de glicoproteínas es esencial, entre otras funciones para el reconocimiento de determinados hongos patógenos por parte del sistema inmune y durante la respuesta sexual para el reconocimiento celular de tipos sexuales opuestos (Hoyer, 2001; Verstrepen and Klis, 2006).

En *S. pombe* el tratamiento con  $\beta(1,3)$ -glucanasas libera aproximadamente el 50% de las proteínas lo que sugiere que el resto están ancladas a la pared a través del  $\alpha(1,3)$ -

glucano (Durán and Pérez, 2004). Recientemente, se ha analizado el proteoma de la pared celular de esta levadura y se han añadido algunas proteínas nuevas (de Groot et al., 2007) a las descritas (de Groot et al., 2003).

### 2.1.4 Quitina

Está formada por cadenas lineales de N-acetil-D-glucosamina unida mediante enlaces  $\beta(1,4)$ . A pesar de que algunos autores han identificado residuos de glucosamina en la pared celular de *S. pombe* (Sietsma and Wessels, 1990), no se ha detectado la presencia de quitina mediante estudios de difracción de rayos-X ni por tinción con la aglutinina de germen de trigo (WGA). Sin embargo, sí se ha detectado actividad quitín sintasa en las ascosporas de *S. pombe*, aunque el polímero sintetizado podría corresponder a quitosán que es la quitina desacetilada (Arellano et al., 2000).

### 2.1.5 Ensamblaje de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*

Mediante estudios de microscopía de barrido se ha observado que la regeneración de la pared celular de los protoplastos comienza de forma polarizada en un determinado lugar, mediante la formación de una red de fibrillas de  $\beta$ -glucano que se extiende por la superficie celular rodeando los protoplastos (Osumi et al., 1998).

En los mutantes con defectos en la síntesis de  $\alpha$ -glucano, las fibrillas de  $\beta$ -glucano no se agrupan en haces, por lo que el  $\alpha$ -glucano podría intervenir en la compactación del  $\beta$ -glucano de la pared celular (Konomi, 2003). Los espacios entre las fibras de glucano se rellenan con

POLÍMERO	ESTRUCTURA	GENES
Galactomanano		<i>gpt1</i> <sup>+</sup> <i>och1</i> <sup>+</sup> <i>gma12</i> <sup>+</sup> ...etc.
$\alpha$ glucano		<i>mok1</i> <sup>+</sup> <i>mok12</i> <sup>+</sup> <i>mok13</i> <sup>+</sup> <i>mok14</i> <sup>+</sup>
$\beta$ glucano		<i>rho1</i> <sup>+</sup> <i>bgs1</i> <sup>+</sup> <i>bgs2</i> <sup>+</sup> <i>bgs3</i> <sup>+</sup> <i>bgs4</i> <sup>+</sup>

Figura 7: Esquema de la composición y estructura química de los principales polímeros de la pared celular *S. pombe*. Se indican algunos de los genes que codifican las actividades enzimáticas implicadas en la biosíntesis de estos polímeros.

galactomanano (Osumi et al., 1998). El  $\beta$ -glucano no sólo es el primer componente que se sintetiza en la pared, sino que es necesario para que se ensamblen el resto de los componentes ya que cuando se inhibe la síntesis de  $\beta$ -glucano con Aculeacina A, no se forman los haces de microfibrillas y tampoco se deposita ninguno de los otros polímeros de la pared (Osumi et al., 1998; Osumi et al., 1989).

En las esporas la síntesis de  $\beta$ -glucano también precede a la de  $\alpha$ -glucano y a la de quitina (García et al., 2006; Martín et al., 2000b). En cuanto al  $\beta(1,6)$ -glucano, podría conectar la capa de glicoproteínas más externa con la capa interna de polisacáridos de la pared celular, aunque las evidencias en este sentido no son tan claras como en *S. cerevisiae* (Roh et al., 2002; Sugawara et

al., 2004).

La cantidad y composición de los polímeros que forman la pared varían de unas especies a otras. En *S. cerevisiae*, por ejemplo, donde la composición y estructura de la pared han sido estudiadas con mayor detalle, no existe  $\alpha$ -glucano ni  $\beta(1,3)$ -glucano lineal, por el contrario *S. cerevisiae* presenta un 2% de quitina en su pared celular y el manano asociado a las glicoproteínas no lleva galactosa .

## 2.2 Biosíntesis y degradación de los principales polímeros de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe*

### 2.2.1 Síntesis de $\beta(1,3)$ -glucano

La biosíntesis del  $\beta$ -glucano es



catalizada por el complejo enzimático denominado  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa ( $\beta$ -GS) (UDP-glucosa: (1-3)- $\beta$ -D-glucano-3- $\beta$ -D-glucosiltransferasa, E.C. 2.4.1.34). Esta enzima se encuentra asociada a la cara interna de la membrana plasmática y emplea como sustrato UDP-glucosa, formando cadenas lineales de unos 60-700 residuos de glucosa. Se ha desarrollado un sistema *in vitro* para la síntesis de  $\beta$ -glucano. Este sistema necesita ATP y es estimulado por GTP. Gracias en parte a este sistema hoy sabemos que la actividad  $\beta$ -GS está constituida por, al menos, dos componentes: una fracción catalítica y una reguladora (revisado en Cabib et al., 1988; Douglas, 2001).

### 2.2.1.1 Las subunidades catalíticas

En *S. pombe* se han identificado cuatro genes que codifican posibles subunidades catalíticas del complejo  $\beta$ -glucán sintasa: *bgs1<sup>+</sup>*, *bgs2<sup>+</sup>*, *bgs3<sup>+</sup>* y *bgs4<sup>+</sup>* (*bgs* de  $\beta$ -glucan synthase). Todos estos genes son esenciales para la viabilidad de *S. pombe*. Las proteínas Bgs son proteínas transmembranales de elevado peso molecular (aproximadamente 200 kDa) y que presentan un elevado porcentaje de identidad entre sí y con Fks1p y Fks2p, las  $\beta$ -glucán sintasas descritas en *S. cerevisiae* (Mazur et al., 1995). En *S. pombe* algunos de estos genes, como *bgs3<sup>+</sup>* y *bgs4<sup>+</sup>*, fueron identificados a partir de mutantes sensibles o resistentes a compuestos antifúngicos que inhiben la síntesis de la pared (Cortés et al., 2005; Ishiguro et al., 1997; Martín et al., 2003).

#### *bgs1<sup>+</sup>*

Bgs1p, también denominada Cps1p (*de*

*CIPC* (*Isopropyl-N-3-chlorophenyl carbamate*) *sensitive*), fue la primera en describirse como posible subunidad catalítica de la  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa implicada en el proceso de división celular. Los mutantes de *bgs1*, *cps1-N12* y *cps1-191*, no forman el septo de división y se paran en la fase G2 del ciclo celular. Otros mutantes de Bgs1p como *cps1-12* presentan defectos de polaridad adquiriendo una morfología redondeada y a veces ramificada, por lo que además de esencial en el proceso de división, Bgs1p podría ser necesaria para el mantenimiento de la polaridad (Cortés et al., 2007; Ishiguro et al., 1997; Le Goff et al., 1999; Liu et al., 2000b; Liu et al., 1999).

Bgs1p se localiza en el septo durante la citocinesis formando un anillo que aparece en la región interna de la marca de calcoflúor que delimita el septo, pero también se encuentra en los polos, en las proyecciones de conjugación y en las ascosporas (Cortés et al., 2002; Liu et al., 2002). Además, se ha visto que las esporas carentes de *bgs1<sup>+</sup>* al germinar forman septos aberrantes que no se tiñen con calcoflúor y no poseen  $\beta(1,3)$ -glucano lineal, lo que podría ser la prueba definitiva de que Bgs1p es la subunidad responsable de la síntesis del septo primario (Cortés et al., 2007).

#### *bgs2<sup>+</sup>*

Bgs2p es una  $\beta$ -glucán sintasa específica de esporulación; la proteína fue identificada en el proyecto de secuenciación del genoma de *S. pombe* por su homología con las  $\beta$ -glucán sintasas de *S. pombe* y de *S. cerevisiae*. *bgs2<sup>+</sup>* se expresa exclusivamente durante la esporulación y es esencial para que este proceso llegue a buen término

(Martín et al., 2000b). Los mutantes *bgs2Δ* presentan una actividad β-GS reducida y las ascosporas procedentes de cepas parentales carentes de *bgs2<sup>+</sup>* son inmaduras, no se liberan del asca y no germinan. Al microscopio electrónico se observa que su pared es más fina y apenas se detecta la capa de β-glucano transparente a los electrones (Liu et al., 2000; Martín et al., 2000b).

### *bgs3<sup>+</sup>*

Fue identificado como supresor del fenotipo de hipersensibilidad a antifúngicos (Calcoflúor y Equinocandina) del mutante *ehs2-1* (*equinocandin hipersensitive*) (Carnero et al., 2000; Martín et al., 2003). *Bgs3p* es necesaria para el mantenimiento de la viabilidad y de la polaridad celular durante el crecimiento vegetativo. Las células en las que la expresión de *bgs3<sup>+</sup>* se apaga (cambiando su promotor por el promotor *δ1nmt1*) se redondean, su pared se hace mas gruesa y se produce un aumento del α-glucano probablemente compensando la bajada en la cantidad de β-glucano (Martín et al., 2003).

*Bgs3p* se localiza en la región del septo durante la división celular y en la región de los polos en interfase, además se ha detectado al igual que *Bgs1p* en los lugares de crecimiento polarizado, como las proyecciones de las células en conjugación y el tubo germinativo de las esporas (Martín et al., 2003).

Aunque su función se desconoce, sí se sabe que su producción aumenta cuando hay defectos en la síntesis de las otras subunidades (*Bgs1p* y *Bgs4p*), lo que apunta a un papel de compensación en respuesta a

daños en la pared (Cortés et al., 2007).

### *bgs4<sup>+</sup>*

*bgs4<sup>+</sup>* fue identificado como el gen estructural afectado en el mutante *cwgl-1* (*cell wall glucan 1*), que presenta una actividad β-GS reducida y se lisa masivamente a 37°C (Cortés et al., 2005; Ribas et al., 1991). *Bgs4p* es la β-glucán sintasa mayoritaria, es esencial para la germinación y para el crecimiento vegetativo y es responsable de la mayor parte de la actividad β-GS medida *in vitro* (Cortés et al., 2005).

*Bgs4p* se localiza en los lugares de crecimiento polarizado y en la región del septo durante la citocinesis, en los mismos lugares que *Bgs1p* y *Bgs3p*. Dadas las características de los mutantes de *bgs4* y su localización, se ha propuesto a *Bgs4p* como la principal β-GS implicada en la formación del septo secundario durante la división (Cortés et al., 2005 y J. C. Ribas, comunicación personal).

Tanto *Bgs1p* como *Bgs3p* y *Bgs4p* necesitan del citoesqueleto de actina para localizarse en los sitios de crecimiento aunque no para mantenerse allí (Cortés et al., 2005; Cortés et al., 2002; Martín et al., 2003).

#### 2.2.1.2 La subunidad reguladora: *Rho1p*

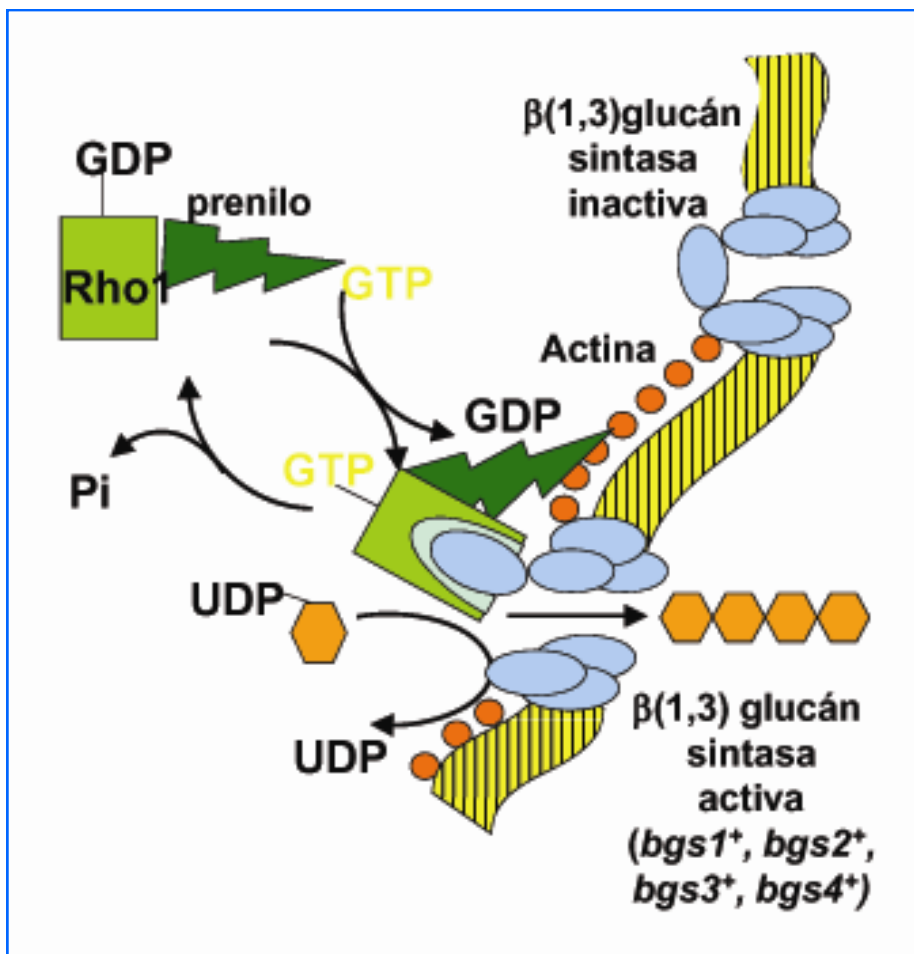
La subunidad reguladora de la actividad β(1,3)-glucán sintasa es la *GTPasa Rho1p* de la que hablaremos en detalle en el **Apartado 3.2.2.1** de regulación de la biosíntesis de la pared. *Rho1p* es prenilada mediante la adición de un resto hidrofóbico

de geranyl-geranilo por el complejo Cwg2p-Cwp1p de la geranyl-geranil transferasa I (Arellano et al., 1998; Arellano et al., 1996; Díaz et al., 1993).

Para que Rho1p realice su función como activador de la síntesis de  $\beta$ -glucano debe estar prenilada y encontrarse en su estado activo, es decir, unida a GTP. La adición de un grupo prenilo (hidrofóbico) permite a Rho1p unirse a la membrana plasmática en las inmediaciones de la subunidad catalítica correspondiente activando así la síntesis de glucano. En la **figura 8** se muestra un esquema de las proteínas de *S. pombe* implicadas en la biosíntesis de  $\beta$  (1,3)-glucano.

## 2.2.2 Síntesis de $\beta$ (1,6)-glucano

En *S. pombe* se sabe muy poco de la síntesis de  $\beta$ (1,6)-glucano, aunque existen genes que codifican proteínas con similitud a las proteínas Kre de *S. cerevisiae*, implicadas en la síntesis de  $\beta$ (1,6)-glucano en esta levadura. Las proteínas Kre de *S. cerevisiae* están localizadas en diferentes puntos de la ruta de secreción (Shahinian and Bussey, 2000). Los estudios de inmunolocalización de este polímero en *S. pombe* lo asocian a vesículas de la ruta secretora y a la cara interna de la membrana plasmática, lo que indica que al menos las etapas iniciales de la síntesis del  $\beta$ (1,6)-glucano ocurren en el retículo endoplásmico (RE) o en el aparato de Golgi (Humbel et al., 2001).



**Figura 8.** Modelo propuesto para la activación de la  $\beta$  (1,3) glucán sintasa. El complejo enzimático, formado por al menos 2 subunidades, se localiza en la cara interna de la membrana. La GTPasa Rho1p, la subunidad reguladora, es la encargada de la activación del complejo catalítico (Bgs1p, Bgs2p, Bgs3p y Bgs4p). Rho1p debe ser prenilada previamente para poder anclarse a la membrana y realizar su función activadora (Adaptado de Drgonova *et al.*, 1999).

Respecto a la regulación de la biosíntesis de este polímero, apenas existen datos. Mediante ensayos *in vitro* en *S. cerevisiae*, se ha comprobado que la síntesis del  $\beta(1,6)$ -glucano es dependiente de GTP y que la GTPasa Rho1p parece estar implicada en su formación (Vink et al., 2004).

### 2.2.3 Síntesis de $\alpha$ -glucano

Se han identificado varios genes en *S. pombe* que codifican posibles subunidades catalíticas de la  $\alpha$ -GS, denominados genes *mok* (*m*orphological and *k*inase *i*nhibitor *s*upersensitive): *mok1*<sup>+</sup>, *mok11*<sup>+</sup>, *mok12*<sup>+</sup>, *mok13*<sup>+</sup> y *mok14*<sup>+</sup>.

#### *mok1*<sup>+</sup>/*ags1*<sup>+</sup>

*mok1*<sup>+</sup>/*ags1*<sup>+</sup> es esencial para la viabilidad y parece ser el responsable de la síntesis de  $\alpha$ -glucano Durante el crecimiento vegetativo (Hochstenbach et al., 1998; Katayama et al., 1999b).

En los mutantes *mok1* el nivel de  $\alpha(1,3)$ -glucano se encuentra reducido. Pese a ello, la pared está engrosada y desorganizada, perdiendo la estructura trilaminar característica de la estirpe silvestre. Por otro lado, la sobreexpresión de *mok1*<sup>+</sup> produce un incremento de más de tres veces en la cantidad de  $\alpha$ -glucano en la pared celular.

La proteína Mok1p presenta dos grandes dominios, uno de ellos es similar al encontrado en proteínas de tipo glicosil hidrolasa ( $\alpha$ -amilasas) y el otro presenta un número significativo de residuos idénticos con proteínas con actividad transglicosidasa (Hochstenbach et al., 1998; Katayama et al.,

1999b). Mok1p se localiza en los lugares donde se produce crecimiento activo, el septo durante la división celular y en la región de los polos en interfase (Katayama et al., 1999b).

#### *mok11*<sup>+</sup>, *mok12*<sup>+</sup>, *mok13*<sup>+</sup> y *mok14*<sup>+</sup>

En el genoma de *S. pombe* existen otros cuatro genes que codifican proteínas parálogas a Mok1p, denominadas Mok11p, Mok12p, Mok13p y Mok14p. Ninguno de estos genes es esencial para el crecimiento vegetativo, sin embargo son importantes en el proceso de maduración de las esporas (García et al., 2006).

*mok12*<sup>+</sup> y *mok13*<sup>+</sup> son responsables de la biosíntesis del  $\alpha(1,3)$ -glucano en esporulación. Los mutantes *mok12* $\Delta$  y *mok13* $\Delta$  presentan una disminución del  $\alpha$ -glucano de la pared de las ascosporas y como consecuencia éstas son más sensibles al calor y a los tratamientos con solventes orgánicos. En el caso de *mok12* $\Delta$ , apenas un 7% de las esporas es viable (García et al., 2006). *mok14*<sup>+</sup> es necesario para la síntesis de un polímero de naturaleza amiloidea formado mayoritariamente por enlaces  $\alpha(1,4)$ . La proteína Mok14 marcada con GFP se distribuye entre la envuelta de la ascospora y la del asca, y es necesaria para que se desarrolle el color pardusco característico de las esporas de *S. pombe* y que les da el color marrón-pardusco en presencia de vapores de yodo (García et al., 2006).

### 2.2.4 Síntesis de Galactomanano

En *S. pombe* muchas de las glicoproteínas secretadas a la pared celular (tanto N- como O-glicosiladas) están

fuertemente galactosiladas. Las galactomanoproteínas representan del 9 al 14% de los azúcares de la pared celular.

La glicosilación de las proteínas de la pared celular se produce en el RE y en el aparato de Golgi. En el RE se añaden los polisacáridos de manosa, cadenas cortas unidas a residuos de serina/treonina mediante enlaces O-glicosídicos o cadenas más largas que se unen a residuos de asparagina mediante enlaces N-glicosídicos. La adición de galactosa y la modificación de las cadenas de manosa se produce posteriormente en el aparato de Golgi (revisado en Gemmill and Trimble, 2004).

En *S. pombe* se han caracterizado varios genes *oma* que codifican O-manosil-transferasas y se ha visto que algunas de ellos son esenciales para el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Willer et al., 2005). También se han identificado mutantes afectados en la N-glicosilación de las proteínas de la pared celular (Umeda et al., 2000; Ziegler et al., 1994), y se han descrito genes que codifican transportadores de UDP-galactosa al lumen del aparato de Golgi (Gms1p) y galactosiltransferasas que transfieren galactosa a las cadenas de manosa (Gma12p, Gth1p, Gmh3p) (Chappell et al., 1994; Chappell and Warren, 1989; Ohashi and Takegawa, 2010; Tabuchi et al., 1997b). Sin embargo, a pesar de conocer muchas de las actividades enzimáticas implicadas todavía se sabe muy poco del proceso de biosíntesis y ensamblaje del galactomanano.

### 2.2.5 Glucanosil-transferasas, $\alpha$ y $\beta$ glucanasas

La síntesis de  $\beta(1,3)$ -glucano no sólo

necesita del complejo enzimático de la  $\beta$ -GS, puesto que este glucano recién sintetizado permanece desorganizado hasta que se forman enlaces covalentes entre sus cadenas y otros componente de la pared celular. La actividad enzimática responsable de la elongación de las cadenas de  $\beta(1,3)$ -glucano está codificada por la familia de genes *GAS* (de glucanosil transferasas) en *S. cerevisiae* (Ragni et al., 2007).

En *S. pombe* existen 4 genes que codifican proteínas con similitud a las glucanosil-transferasas de *S. cerevisiae*. Se les ha denominado *gas1<sup>+</sup> - gas4<sup>+</sup>*. De ellas se sabe que Gas4p es requerida en esporulación. Los mutantes *gas4* nulos no forman la pared de las esporas correctamente y éstas son incapaces de germinar (Medina-Redondo et al., 2008).

También se han identificado dos tipos de actividades glucanasas diferentes. Una actividad endo- $\alpha$ -glucanasa, llevada a cabo por Agn1p y Agn2p, y una actividad endo- $\beta$ -glucanasa, llevada a cabo por Eng1p y Eng2p. Aunque ninguna de estas dos actividades es esencial para la separación celular en células vegetativas, la ausencia de ambas produce un fenotipo multiseptado (revisado por Roncero and Sánchez, 2010; Sipiczki, 2007).

#### *agn1<sup>+</sup> y agn2<sup>+</sup>*

Agn1p y Agn2p se identificaron por su similitud con  $\alpha$ -glicosil hidrolasas de otros hongos como *Trichoderma* y *Penicilium*. Ambas pertenecen a la familia de endo- $\alpha$  (1,3)-glicosilhidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\alpha(1,3)$  glicosídicos del  $\alpha$ -glucano, liberando pentasacáridos



(Dekker et al., 2004).

### *agn1<sup>+</sup>* y *agn2<sup>+</sup>*

*agn1<sup>+</sup>* se expresa de manera cíclica con un pico Durante la división celular, lo que coincide con un aumento en la actividad  $\alpha$ -glucanasa (dependiente de Agn1p) en este intervalo y con su localización en el septo de división (García et al., 2005). Los mutantes *agn1 $\Delta$*  acumulan células con uno o tres septos. Se ha propuesto a Agn1p como la glucanasa responsable de la digestión del  $\alpha$ -glucano de la pared lateral necesario para la separación de la células hijas al final de la división celular (Alonso-Núñez et al., 2005; Dekker et al., 2004; García et al., 2005).

*agn2<sup>+</sup>* se expresa durante el proceso de esporulación y se localiza en el epiplasma del asca. Agn2p colabora en el proceso de endólisis de la pared del asca contribuyendo con su actividad  $\alpha$ -glucanasa a la liberación de las ascosporas (Dekker et al., 2004; Dekker et al., 2007).

### *eng1<sup>+</sup>* y *eng2<sup>+</sup>*

Eng1p y Eng2p son endo- $\beta$ (1,3)-glicosil hidrolasas que catalizan la hidrólisis de los enlaces  $\beta$ (1,3) glicosídicos del  $\beta$ (1,3)-

glucano lineal, liberando, disacáridos y trisacáridos (Martín-Cuadrado et al., 2003; Martín-Cuadrado et al., 2008a).

Eng1p al igual que Agn1p presenta un péptido señal y se secreta al medio, localizándose en la región del septo durante la división celular. Los mutantes *eng1 $\Delta$*  forman pequeñas cadenas de cuatro células como resultado de un defecto durante la digestión del septo primario al final de la división celular (Martín-Cuadrado et al., 2003).

La expresión de *eng1<sup>+</sup>* también es cíclica y presenta un máximo momentos antes de la formación del septo. Al igual que ocurre con Eng1p de *Saccharomyces cerevisiae*, en *S. pombe* la expresión de las glucanasas *agn1<sup>+</sup>* y *eng1<sup>+</sup>* se encuentra bajo el control del factor de transcripción Ace2p que controla también la expresión de otras proteínas relacionadas con la separación celular (Alonso-Núñez et al., 2005; Dekker et al., 2006). Además de su expresión, Agn1p y Eng1p están reguladas a nivel de su localización que depende del anillo de septinas y del exocisto (Martín-Cuadrado et al., 2005). En el caso de Eng1p también se sabe que la presencia de un dominio de unión a carbohidrato (CBD) en el extremo carboxilo-terminal es necesaria para que Eng1p se localice alrededor del septo (Martín-Cuadrado et al., 2008b).

La función de Eng2p es similar a la Agn2p, ambas colaboran hidrolizando la pared del asca que es un requisito previo a la liberación de las esporas o dehiscencia (Encinar del Dedo et al., 2009). Sin embargo Eng2p también se expresa durante el crecimiento vegetativo donde realiza una



**Figura 9.** Morfología del mutante *eng1 $\Delta$*  al microscopio óptico y teñido con calcoflúor, un colorante fluorescente con afinidad por el septo (Martín-Cuadrado et al., 2003).

función en morfogénesis (Javier Encinar, comunicación personal).

### 3. *Dinámica y regulación de la pared celular de *Schizosaccharomyces pombe**

La pared celular es una estructura muy dinámica y susceptible de sufrir numerosas modificaciones en la composición y/o estructura, tanto a lo largo de las distintas etapas del ciclo de vida de la levadura como en respuesta a estímulos y condiciones ambientales. A pesar de su rigidez, es necesario que esta envoltura se adapte a los cambios morfológicos que ocurren durante el ciclo celular, como por ejemplo, el crecimiento por uno o ambos polos o la formación del septo que separa la célula madre de la célula hija durante el crecimiento vegetativo. Además en respuesta a señales extracelulares como puede ser la presencia de feromonas de tipo sexual opuesto, las células responden formando la denominada “proyección sexual” en la dirección en la que se encuentra la otra célula, lo que precede a la disolución de la pared de ambas células necesaria para la fusión citoplasmática y nuclear.

Lógicamente, todas estas alteraciones deben estar controladas por una estricta regulación de las rutas de biosíntesis y degradación de polímeros que constituyen la pared celular de tal manera que las actividades enzimáticas estén presentes únicamente en el momento y el lugar necesarios para desempeñar su función (Durán and Pérez, 2004; Pérez and Rincón, 2010; Roncero and Sánchez, 2010).

Finalmente la célula debe responder a

cualquier daño en la envoltura que ponga en peligro su integridad, utilizando para ello una serie de mecanismos compensatorios o mecanismos de defensa que permitan cambiar la composición y/o la estructura en las condiciones en las que es imposible sintetizar una pared celular normal (Madrid et al., 2006).

#### 3.1 Regulación de la biosíntesis de $\beta(1,3)$ -glucano

El  $\beta(1,3)$ -glucano es el primer polímero que se deposita en la nueva pared en formación y probablemente en torno a él se ensamblan el resto de los componentes (Osumi et al., 1989; Roh et al., 2002). Rho1p es la subunidad reguladora de la actividad  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa ( $\beta$ -GS) y actúa como un interruptor molecular que cicla entre una forma activa (unida a GTP) y una forma inactiva (unida a GDP) (**figura 10**). Como ya hemos visto anteriormente, Rho1p estimula la actividad  $\beta$ -GS en su forma prenilada y unida a GTP (Arellano et al., 1996), lo cual explicaría de manera muy simple el mecanismo por el cual la célula puede controlar la síntesis de  $\beta(1,3)$ -glucano (**figura 8**).

Rho1p es una molécula central en la regulación coordinada de la biosíntesis del  $\beta(1,3)$ -glucano y otros procesos que participan en la secreción polarizada (García et al., 2006b; Pérez and Rincón, 2010).

##### 3.1.1 La GTPasa Rho1p

Rho1p es esencial en *S. pombe* y no se han descrito mutantes puntuales, ésta es una de las razones por las cuales es difícil separar su papel en la biosíntesis de la pared celular,

de su papel como regulador del citoesqueleto de actina o en la secreción polarizada.

Las células que sobreexpresan *rho1*<sup>+</sup> poseen una pared mucho más gruesa y en ocasiones aparecen células encadenadas. Cuando se elimina la expresión de *rho1*<sup>+</sup> (cambiando su promotor por un promotor reprimible por tiamina), disminuye la actividad β(1,3)-glucán sintasa y las células se lisan la mayoría como parejas justo en el momento de la separación, lo que indicaría un papel fundamental de Rho1p en citocinesis (Arellano et al., 1997; Arellano et al., 1996).

Rho1p está también implicada en otros procesos morfogénicos. Rho1p funciona por debajo del marcador de polaridad Tea1p, y se localiza en los lugares de crecimiento celular, polos y septo (figura 11). La disminución progresiva de Rho1p en las células produce la desaparición de la actina polimerizada, mientras que un incremento de su expresión da lugar a puntos de actina

mayores y distribuidos aleatoriamente por toda la célula (Arellano et al., 1997; Nakano et al., 1997).

Parece ser que un equilibrio adecuado en la activación de Rho1p es importante para la regulación del citoesqueleto de actina, sin embargo aún no se ha descrito ninguna proteína que medie en este proceso. No está claro si alguna de las forminas de *S. pombe* interacciona con Rho1p y tampoco hay ningún estudio que relacione a Rho1p con el complejo Arp2/3 (revisado en García et al., 2006b).

### 3.1.1.1 Los reguladores de la GTPasa Rho1p

Rho1p y en general las GTPasas actúan como interruptores moleculares que ciclan entre una forma activa (unida a GTP) y una forma inactiva (unida a GDP) (figura 10). El estado unido a nucleótido es regulado por “guanine exchange factors” (GEFs), que intercambian GDP por GTP activando a la

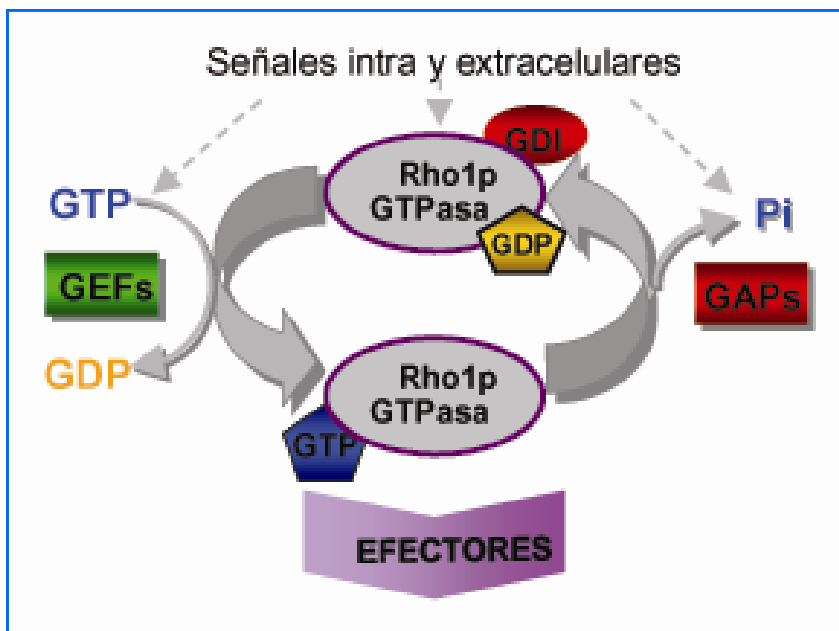


Figura 10. Regulación del ciclo de las GTPasas. Los GEFs favorecen el intercambio de GDP por GTP activando a la GTPasa. Los GAPs favorecen la hidrólisis de GTP inactivando a la GTPasa. Los GDIs, secuestran a la GTPasa en su forma prenilada impidiendo que se una a la membrana



GTPasa, y la subsiguiente hidrólisis del GTP es acelerada por las “GTPase activating proteins” (GAPs) que la inactivan. Su asociación a la membrana es controlada por GDIs de “GDP dissociation inhibitor” que secuestran a la GTPasa en el citoplasma uniéndose a su forma prenilada e impidiendo que ésta se localice en la membrana donde desarrolla su actividad. GEFs y GAPs modulan la actividad de Rho1p y por consiguiente deberían modular la actividad glucán sintasa y la biosíntesis de la pared celular (García et al., 2006b).

Hasta ahora se han identificado tres GEFs de Rho1p, denominados Rgf1p, Rgf2p y Rgf3p, tres reguladores negativos, Rga1p, Rga5p y Rga8p y una proteína GDI, Rdi1p (Nakano et al., 2003; Nakano et al., 2001; Yang et al., 2003). Rdi1p, es el único GDI de *S. pombe*, que también se une a Rho4p y a Cdc42p, aunque se desconoce el proceso celular en el que participa (Nakano et al., 2003). Es posible que además de los descritos, otros GEFs y GAPs controlen la actividad de Rho1p en *S. pombe*.

*rgf3<sup>+</sup>* fue clonado en nuestro laboratorio por complementación de un mutante hipersensible a drogas que interfieren con la biosíntesis de la pared celular. Es un gen esencial y la disminución de su expresión causa lisis celular, con un fenotipo muy similar a la disrupción de *rho1<sup>+</sup>* (figura 13). La expresión de *rgf3<sup>+</sup>* presenta un pico durante la septación de una manera dependiente de Ace2p y la proteína se localiza exclusivamente en la región del septo, como un anillo que se contrae (figura 11) (Iwaki et al., 2003; Morrell-Falvey et al., 2005; Mutoh et al., 2005; Tajadura et al., 2004).

Se ha visto que Rgf3p activa la  $\beta$ -GS y que controla la cantidad de  $\beta$ -glucano de la pared celular. Es probable que Rgf3p estimule, a través de Rho1p, a una glucán sintasa cuya función sea crucial para la correcta septación. También, podría ser necesaria para el reclutamiento de Rho1p en esa zona (Tajadura et al., 2004).

*rgf1<sup>+</sup>* y *rgf2<sup>+</sup>*, también son activadores de Rho1p (García et al., 2006a; Mutoh et al., 2005). Rgf1p regula específicamente a Rho1p durante el crecimiento polarizado (García et al., 2006a). Rgf1p se localiza en los polos en células en interfase y en el septo de división en células en mitosis (figura 12). Durante la formación del septo forma una placa de fluorescencia similar a la observada en el caso de Rho1p. Rgf1p activa el complejo  $\beta$ -GS que lleva a Bgs4p y participa en la activación del crecimiento del polo nuevo durante NETO. En ausencia de Rgf1p la actina se mantiene mayoritariamente en el polo antiguo y las células crecen solo por este polo.

Los mutantes *rgf1 $\Delta$*  son sensibles a caspofungina y se lisan solo por uno de polos (figura 13). Curiosamente mientras que otros mutantes con defectos en crecimiento bipolar como *tea1 $\Delta$* , *tea4 $\Delta$*  y *bud6 $\Delta$*  crecen a

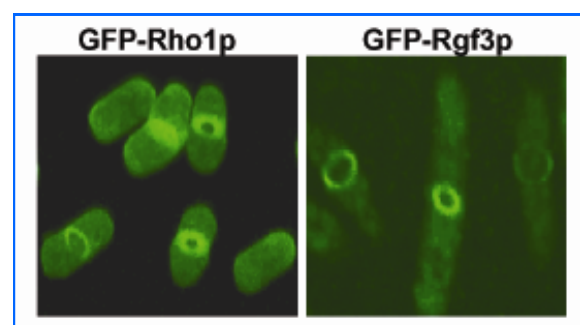
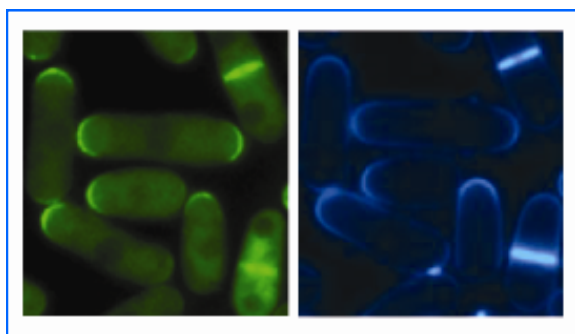


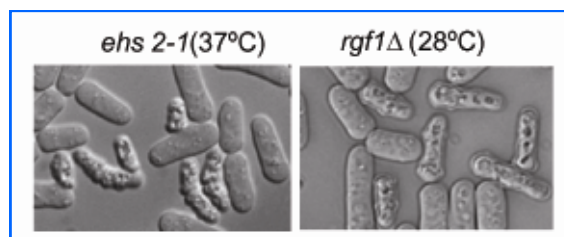
Figura 11 . Localización de GFP-Rho1p y GFP-Rgf3p mediante microscopía confocal.

la misma velocidad que la cepa silvestre, los mutante *rgf1Δ* crecen más despacio y la viabilidad es menor. Esto se debe probablemente a que el fallo al iniciar el crecimiento bipolar coincide con la lisis celular, acoplando por consiguiente una transición en el estadio de polaridad con la biosíntesis de la pared celular (García et al., 2006a).

Rgf2p es esencial en el proceso de diferenciación sexual (García et al., 2009a). La proteína Rgf2p marcada con GFP se localiza en la periferia de la espora probablemente asociada a la membrana interna de las mismas. Las ascosporas producidas a partir de cruces homocigóticos *rgf2Δ* son oscuras, inmaduras y su porcentaje de supervivencia es del 1% comparado con las ascosporas silvestres. Este fenotipo es muy parecido al de las ascosporas mutantes *bgs2Δ*, (la  $\beta$ -GS específica del proceso de esporulación). De hecho, el fenotipo de las esporas procedentes de los cruces homocigóticos *rgf2Δ bgs2Δ* es prácticamente indistinguible del de las esporas procedentes de los cruces de los mutantes *rgf2Δ x rgf2Δ* o *bgs2Δ x bgs2Δ*. Además la actividad  $\beta$ -GS también está disminuida en los diploides *rgf2Δ* en condiciones de esporulación.



**Figura 12** . Localización de la proteína Rgf1p marcada con GFP durante el crecimiento vegetativo.



**Figura 13** . Fenotipo de lisis en el mutante *ehs2-1 (rgf3)*, 3h a 37°C. Las células se lisan es parejas. En el mutante *rgf1Δ* las células se lisan individualmente.

Rgf2p también desempeña un papel en el crecimiento vegetativo. La cepa *rgf1Δ rgf2Δ* es inviable mientras que cada uno de los mutantes individuales es viable. Además, la sobreexpresión de Rgf2p (con su propio promotor en un plásmido multicopia) es capaz de suprimir totalmente el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *rgf1Δ* y parcialmente el defecto en crecimiento bipolar (García et al., 2009a).

En cuanto a los GAPs conocidos de Rho1p, ninguno es esencial aunque se ha visto que la eliminación de *rga1<sup>+</sup>* ralentiza el crecimiento y produce alteraciones morfológicas similares a las producidas por la sobreexpresión de Rho1p (Nakano et al., 2001). *rga5<sup>+</sup>* participa en la regulación de la actividad  $\beta$ -GS y en el mantenimiento de la integridad celular (Calonge et al., 2003). Por su parte, *rga8<sup>+</sup>* se aisló en una búsqueda de proteínas que interaccionan con Pak1/Skh1p pero su función apenas se conoce (Yang et al., 2003).

### 3.1.1.2 Los efectores de la GTPasa Rho1p

Rho1p es capaz de activar la síntesis del  $\beta(1,3)$ -glucano a través de otros efectores. En *S. cerevisiae* Rho1p activa a

Pck1p y ésta a su vez activa la ruta de MAP kinasas implicada en el mantenimiento de la integridad celular (Kamada et al., 1996; Levin, 2005a; Nonaka et al., 1995) (**figura 14**).

En *S. pombe* se han descrito dos proteínas homólogas a Pck1: Pck1p y Pck2p (Toda et al., 1993). Rho1p en su estado activo interacciona con Pck1p y Pck2p (Arellano et al., 1999b; Sayers et al., 2000). Aunque no está muy claro el modo en que Rho1p regula a Pck1p y Pck2p parece que su presencia estabiliza a ambas proteínas y también es necesario para que éstas se localicen correctamente (Arellano et al., 1999b).

Se ha demostrado que Pck2p es un regulador activo de la enzima  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa (Arellano et al., 1999b) y parece por tanto que Rho1p es capaz de activar indirectamente la  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa a través de Pck2p.

### 3.2 Regulación de la biosíntesis de $\alpha(1,3)$ -glucano

Otra GTPasa perteneciente a la familia Rho, Rho2p, parece ser la responsable de la regulación de la biosíntesis del  $\alpha(1,3)$ -glucano en *S. pombe*. Rho2p se localiza en las zonas de crecimiento y aunque no es esencial, su interrupción genera células redondeadas y este fenotipo no se suprime por la sobreexpresión de *rho1*<sup>+</sup> (Hirata et al., 1998).

Existen una serie de evidencias que relacionan a Rho2p con la biosíntesis de  $\alpha(1,3)$ -glucano. La sobreexpresión de *rho2*<sup>+</sup>, a

diferencia de la de *rho1*<sup>+</sup>, produce un aumento en la cantidad de  $\alpha(1,3)$ -glucano de la pared y este aumento no se produce en los mutantes *pck2* $\Delta$  (Calonge et al., 2000). Por otro lado, Pck2p es necesaria para que la  $\alpha(1,3)$ -glucán sintasa, Mok1p, se localice correctamente y desarrolle su actividad catalítica (Katayama et al., 1999a).

Además, se sabe que Rho2p y Pck2p están íntimamente relacionadas, ya que interaccionan físicamente y los mutantes en estos dos genes presentan fenotipos similares, una pared celular más delgada y sensibilidad al tratamiento con  $\beta$ -glucanasas (Arellano et al., 1999b; Calonge et al., 2000). El modo en que Rho2p interacciona con Mok1p no está del todo claro, sin embargo todos los datos apuntan a que esta interacción se produce a través de Pck2p.

Además de su papel en la biosíntesis de la pared celular, Rho2p también participa a través de Pck2p en la regulación de la cascada de MAP kinasas liderada por Pmk1p (llamada cascada de integridad celular) (ver Apartado 4.2) (Loewith et al., 2000; Ma et al., 2006; Sengar et al., 1997; Sugiura et al., 1999; Toda et al., 1993; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997).

En resumen Rho2p activa a través de Pck2p la biosíntesis de  $\alpha$ -glucano y la ruta de MAPK Mkh1p-Pek1p-Pmk1p. Recientemente se han descrito dos proteínas con actividad GAP para Rho2p que parecen especificar diferentes funciones. Rga2p regula la morfología de la célula y aquellas funciones de Rho2p más relacionadas con la síntesis de  $\alpha$ -glucano. (Villar-Tajadura et al., 2008). Rga4p es un GAP de Rho2p que modula negativamente la ruta de MAPK de

integridad y su principal efector la MAP kinasa Pmk1p (Soto et al., 2010).

### 3.3 Papel de Cdc42p, Rho3p y Rho4p en la estructura y remodelación de la pared celular

Un gran número de estudios en diversos organismos han desvelado que las GTPasas de bajo peso molecular funcionan como moléculas de señalización claves en el desarrollo de la polaridad. La familia Rho en *S. pombe* está compuesta por seis miembros: Cdc42p, Rho1p, Rho2p, Rho3p, Rho4p y Rho5p. De los cuales sólo dos, Cdc42p y Rho1p, son esenciales para la supervivencia de la célula (Pérez and Rincón, 2010).

#### 3.3.1 Cdc42p

En *S. pombe*, Cdc42p participa en el control del crecimiento celular polarizado y es necesaria para mantener la morfología cilíndrica típica de esta levadura. Las células que carecen de actividad Cdc42p son redondeadas, pequeñas y densas y son incapaces de conjugar (Miller and I., 1994). Los mutantes de algunos activadores y efectores de Cdc42p presentan una morfología redondeada y defectos en la formación de los cables y parches de actina (Hirota et al., 2003; Martín et al., 2007; Murray and Johnson, 2001; Otilie et al., 1995; Sells et al., 1998).

Cdc42p junto con Bud6p es necesaria para activar y localizar a la formina For3p encargada de la formación de los cables de actina (Glynn et al., 2001; Martín et al., 2007). Un mutante puntual de esta GTPasa, *cdc42-1625*, presenta unos cables muy cortos y finos y defectos en la localización de

For3p. Cdc42p libera el estado auto-inhibido y por tanto inactivo de For3p (Martín et al., 2007).

En *S. pombe* el ensamblaje de los parches de actina tiene lugar al menos por dos vías diferentes; una depende de Wsp1p y la verprolina Vrp1p, y la otra depende de la miosina Myo1p, ambas rutas convergen para activar al complejo Arp2/3 (Sirotkin et al., 2005). En *S. cerevisiae* Cdc42p controla la localización y la activación del complejo formado por Bee1p, miosinas de tipo I y Vrp1, sin embargo en *S. pombe* no se sabe si existe interacción entre Cdc42p y los activadores del complejo Arp2/3.

Cdc42p se localiza en los polos, en el sitio de división y en endomembranas (Merla and Johnson, 2000). Se han identificado dos activadores de Cdc42p, Scd1p y Gef1p, un regulador negativo, Rga4p y dos efectores directos, las proteínas kinasas denominadas Pak1p/Shk1p/Orb2p y Pak2p/Shk2p (p21-GTPase-activated protein kinase) (Coll et al., 2003; Hirota et al., 2003; Otilie et al., 1995; Sells et al., 1998).

Scd1p es un activador de Cdc42p y un efector de Ras1p. Scd1p es necesario para la respuesta sexual y durante el crecimiento vegetativo para mantener la morfología activando la ruta Ras1p-Scd1p-Cdc42p-Pak1p. Gef1p actúa principalmente durante la citocinesis, aunque los mutantes *gef1Δ* también presentan defectos en NETO. Recientemente se ha visto que la kinasa Orb6p controla la localización de Cdc42p activo probablemente a través de Gef1p (Das et al., 2009).

El único GAP conocido de Cdc42p es

Rga4p. Rga4p se localiza en el septo y forma un cinturón amplio en la zona central pero está excluido de los polos. Rga4p interacciona con la kinasa Pom1p (esencial en NETO). En el mutante *pom1Δ*, Rga4p se localiza (de forma aberrante) en el polo que no crece y en consecuencia Cdc42p se distribuye de manera monopolar (Tatebe et al., 2008).

Los efectores de Cdc42p mejor conocidos son las proteínas PAK, Shk1p/Pak1p/Orb2p y Shk2p/Pak2p. *shk1<sup>+</sup>* es un gen esencial necesario para el crecimiento polarizado, control de la progresión del ciclo celular, citocinesis y conjugación (Kim, 2003; Loo and Balasubramanian, 2008; Marcus et al., 1995; Otilie et al., 1995; Verde et al., 1995). *shk2<sup>+</sup>* no es esencial y sus funciones parecen ser redundantes con respecto a las de *shk1<sup>+</sup>* (Merla and Johnson, 2001; Sells et al., 1998; Yang et al., 1998).

### 3.3.2 Rho3p y Rho4p

Rho3p y Rho4p participan en la regulación de la secreción Durante la separación celular.

En *S. cerevisiae*, Rho3p está involucrada en el transporte de las vesículas endocíticas a través de los cables de actina y en el anclaje de éstas a la membrana plasmática (Adamo et al., 1999). En *S. pombe*, los mutantes nulos *rho3Δ* presentan células multitabicadas y acumulan vesículas a 37°C. Rho3p interacciona con la formina For3p y modula las funciones del exocisto (Nakano et al., 2002; Wang et al., 2003).

Rho4p es la única GTPasa de la familia Rho que se localiza exclusivamente en la

región de división. Esta proteína es necesaria para la degradación del septo durante la citocinesis y regula la secreción y localización de las glucanasas Agn1p y Eng1p (Nakano et al., 2003; Santos et al., 2003; Santos et al., 2005).

### 3.3.3 Rho5p

Rho5p es una proteína muy parecida a Rho1p (86% de identidad). Se expresa bajo condiciones de estrés y en ausencia de Rho1p. Cuando falta Rho1p, la sobreexpresión de Rho5p mantiene la actividad β-GS y la organización del citoesqueleto de actina, aunque de forma menos eficiente (Nakano et al., 2005; Rincón et al., 2005).

## 4. La ruta de MAPK Pmk1p y el mantenimiento de la integridad celular en *S. pombe*

En *S. pombe* se han descrito tres cascadas de MAPKs hasta el momento: la de respuesta a feromonas, con Spk1p como MAP kinasa (Gotoh et al., 1993); la de respuesta a estrés en la que Stylp/Spc1p es la MAPK (Shiozaki and Russell, 1995a) y la de mantenimiento de la integridad celular liderada por Pmk1p/Spm1p (MAPK).

### 4.1 Composición de la ruta de MAPK liderada por Pmk1p

La cascada de señalización de mantenimiento de la integridad celular está constituida por tres kinasas Mkh1p, Pek1p/Skh1p y Pmk1p/Spm1p (Loewith et al., 2000; Ma et al., 2006; Sengar et al., 1997; Sugiura et al., 1999; Toda et al., 1993; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997)



(figura. 14).

La eliminación de cualquiera de estas kinasas provoca alteraciones morfológicas y células multitabicadas en condiciones de estrés (37°C, 1M KCl), hipersensibilidad a  $\beta$ -glucanasa y a caspofungina y defectos en fusión vacuolar (Bone et al., 1998; García et al., 2009b; Sengar et al., 1997). Todos estos defectos sugieren una función en homeostasis iónica y en la biosíntesis de la pared celular aunque también podría participar en otros procesos todavía no determinados de manera clara.

Mkh1 (*Mek Kinase Homolog 1*) es la MAPKKK que en su estado activo fosforila a Pek1p (Sengar et al., 1997). Pek1p (*pombe mEK1*), también denominada Skh1p, es la MAPKK y se comporta como un interruptor molecular actuando como un potente regulador negativo de Pmk1p cuando está desfosforilada, de tal manera que la ruta carece de actividad basal, y como activador de Pmk1p, cuando Pmk1p está fosforilada (Sugiura et al., 1999). Este mecanismo contribuye a que en *S. pombe* exista una respuesta de todo o nada en esta vía de MAPKs, diferenciándose de lo que ocurre en *S. cerevisiae* donde la ruta está siempre activa (Martín et al., 2000a).

Pmk1p (*S. pombe MAP Kinase 1*), también denominada Spm1p, es la MAPK de la ruta de integridad. Pmk1p es fosforilada por Pek1p en los residuos Thr<sup>186</sup> y Tyr<sup>188</sup> (Loewith et al., 2000; Sugiura et al., 1999) y desfosforilada e inactivada por la fosfatasa Pmp1p (*S. pombe MAP kinase phosphatase 1*) (Sugiura et al., 1998). Sin embargo, aún no se sabe cómo se transmite la señal desde Pmk1p hacia un “desconocido factor de

transcripción”. Las tres kinasas se localizan en la zona del septo. Mkh1p y Pek1p se localizan en el citoplasma y sólo Pmk1p se localiza a la vez en el citoplasma y en el núcleo pero su localización no cambia en condiciones de estrés (Madrid et al., 2006).

Recientemente se ha descrito que el factor de transcripción Atf1p es fosforilado por Pmk1p en condiciones de daño en la pared (Takada et al., 2007). Estos autores proponen que las rutas de respuesta a estrés y la de integridad celular convergen en el factor de transcripción Atf1p, para activar la expresión de determinados genes que reparen los daños producidos en la pared celular. Sin embargo, no se conocen genes relacionados con la biosíntesis de la pared celular cuya expresión dependa de Atf1p (Chen et al., 2003).

## 4.2 Activación de la ruta de integridad en *S. pombe*

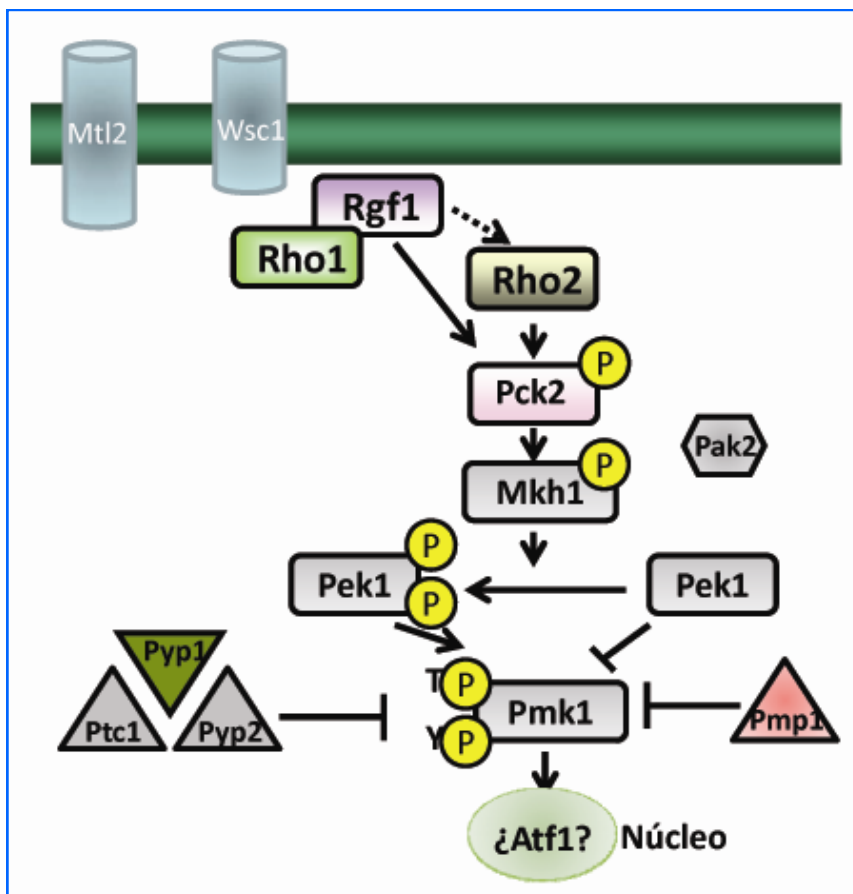
Pmk1p se induce por múltiples condiciones de estrés: estrés hiper o hiposmótico, ausencia de glucosa, daño en la pared celular, alta temperatura y estrés oxidativo (Madrid et al., 2006). En todos los casos, la activación de Pmk1p depende completamente de Mkh1p y de Pek1p, sin embargo, no todos los tipos de estrés activan la cascada a través de Rho2p y de Pck2p. Un ejemplo es la activación de la ruta por estrés oxidativo que es totalmente independiente de Rho2p y de Pck2p (Barba et al., 2008).

La mayoría de los activadores de la cascada se han aislado por que las cepas mutantes de los componentes de esta ruta son capaces de antagonizar los efectos de la eliminación de la calcineurina en la

homeostasis iónica. La eliminación de la subunidad catalítica de la calcineurina, Ppb1p o la inhibición de su actividad mediante inmunosupresores (como FK506), produce hipersensibilidad a  $\text{Cl}^-$ , mientras que la inactivación simultánea de alguno de los miembros de esta ruta de MAPK suprime este fenotipo.

Basándose en esta interacción se ha descrito el fenotipo *vic* (*Viable in the presence of Immunosuppressant and Chlorine ion*), y se ha visto que todos los mutantes nulos de los componentes de la cascada de integridad presentan este fenotipo, es decir son viables en presencia del inmunosupresor FK506 y altas concentraciones de  $\text{MgCl}_2$  (Sugiura et al., 1999; Sugiura et al., 1998).

Para buscar nuevos componentes de la ruta de integridad se realizó un “screening” de mutantes de fenotipo *vic*. Primero se identificó una cepa mutada en el gen *cpp1*<sup>+</sup>, que codifica la subunidad  $\beta$  de la farnesil-transferasa encargada de catalizar la prenilación de las GTPasas Rho2p y Rho3p, y esto condujo a la identificación de Rho2p como un nuevo miembro de la ruta de MAPK, ya que los mutantes *rho2* $\Delta$  también presentan el fenotipo *vic* (Ma et al., 2006). La sobreexpresión de *rho2*<sup>+</sup> deja de ser letal cuando se elimina Mkh1p, Pek1p o Pmk1p de la célula, y lo mismo ocurre al sobreexpresar *pck2*<sup>+</sup>, lo cual sitúa a Rho2p y a Pck2p por encima del módulo de MAPK de la ruta de integridad celular. Además la sobreexpresión de *rho2*<sup>+</sup> o *pck2*<sup>+</sup> incrementa en gran medida los niveles de fosforilación



**Figura 14 : La ruta de integridad celular en *S. pombe*.** Cuando en la célula se producen daños en la pared u otros tipos de estrés como estrés osmótico, etc), una señal es probablemente transmitida a un sensor de superficie que activa a Rgf1p/Rho1p, a Rho2p y/o a otra molécula todavía no identificada. Esta señal activa a Pck2p, que a su vez activa a Mkh1p y con ello al módulo de MAPK Mkh1p-Pek1p-Pmk1p. Se desconoce la activación transcripcional que desencadena en el núcleo la fosforilación de Pmk1p. Las fosfatasas Pmp1p, Pyp1p, Pyp2p y Ptc1p son necesarias para inactivar a Pmk1p, una vez transmitida la señal

de Pmk1p (Ma et al., 2006).

Recientemente se ha descrito Rgf1p como uno de los reguladores de la cascada (García et al., 2009b). Los mutantes *rgf1Δ* muestran el fenotipo *vic* y son incapaces de crecer a altas concentraciones de KCl, ambos fenotipos característicos de los mutantes de la cascada. Rgf1p es necesario para la fosforilación de la MAPK Pmk1p en respuesta a estrés osmótico y a estrés producido por daños en la pared y actúa por encima de Rho2p y de Pck2p (García et al., 2009b) y resultados no publicados de nuestro laboratorio).

### 4.3 La ruta PKC de integridad en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* la ruta de señalización más importante que controla el ensamblaje de la pared es la ruta PKC (**figura 15**). Esta ruta, denominada también ruta de integridad celular, se induce durante los períodos de crecimiento polarizado, como la emergencia de la yema o la formación de la proyección sexual durante la conjugación, o en respuesta a condiciones ambientales que amenazan la estabilidad de la pared celular, tales como estrés térmico, crecimiento en medio hiposmótico o mutaciones que afectan a la estructura de la envoltura (revisado por Lessage and Bussey, 2006; Levin, 2005b).

Esta ruta lleva un módulo “sensor” o “modulo de detección” que activa a Rho1p. Rho1p activa a Pkc1p y el modulo de MAP kinasas, constituido por la MEKK Bck1p, las MEKs redundantes Mkk1p y Mkk2p y la MAPK Slt2p (también denominada Mpk1p). La falta de cualquiera de estas proteínas (en el caso de las MEKs redundantes, la ausencia

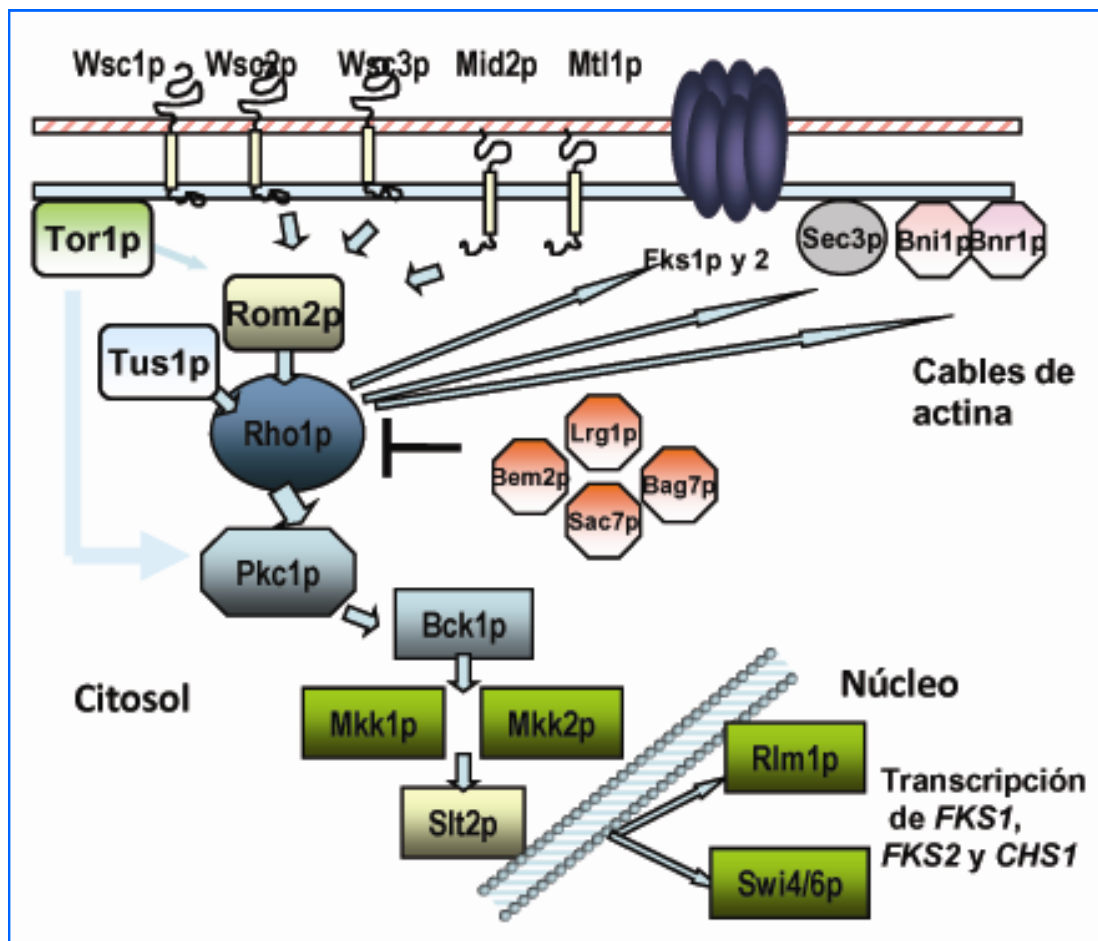
de ambas) conduce a un fenotipo de termosensibilidad suprimible por estabilización osmótica, lo que indica que existe un defecto en la construcción de una pared celular funcional.

Una vez activada, Slt2p fosforila a los factores de transcripción Rlm1p y Swi4/6, lo que produce la transcripción de genes relacionados con el control de la progresión del ciclo celular y con la biosíntesis de la pared celular como *FKS1<sup>+</sup>*, *FKS2<sup>+</sup>* y *CHS3<sup>+</sup>*.

En *S. cerevisiae*, Rho1p está regulado por proteínas GEFs y GAPs. Rom1p, Rom2p y Tus1p son proteínas GEF. Rom1p y Rom2p tienen funciones redundantes en la regulación de Rho1p y participan en la biosíntesis de la pared celular y en los mecanismos de respuesta a estrés. Tus1p y en menor medida Rom2p están implicadas en la localización y activación de Rho1p durante la citocinesis. Ambas se regulan por fosforilación dependiente de la polo kinasa, Cdc5p (Yoshida et al., 2006; Yoshida. S. et al., 2009). Bem2p, Sac7p, Bag7p y Lrg1p son proteínas con actividad GAP descritas para la GTPasa Rho1p (Park and Bi, 2007).

Rho1p, además de su papel crucial en la activación de Pkc1p, activa a las  $\beta$ -GS, Fks1p y Fks2p, a las forminas Bni1p y Bnr1p, al factor transcripcional Skn7p y al componente del exocisto Sec3p. Todas estas proteínas participan en la biosíntesis de la pared celular, en la polarización del citoesqueleto de actina y en la exocitosis (Levin, 2005b).





**Figura 15: La ruta MAP quinasa de integridad celular en *S. cerevisiae*.** Los receptores Wscp, Mid2p y Mtl1p señalizan y activan a Rho1p a través de su GEF Rom2p. Rho1p activa a través de Pkc1p la cascada de MAP quinasa de la ruta de integridad que activan, a través del factor de transcripción Rlm1p, la expresión de genes relacionados con la síntesis de la pared celular como *FKS1*, *FKS2*, y *CHS3*. Rho1p estimula la síntesis de  $\beta$ -glucano directamente como subunidad reguladora de las  $\beta$ -GS Fks1p y Fks2p. Rho1p también regula a través de la forminas Bni1p y Bnr1p la nucleación de cables de actina y junto a Sec3p la exocitosis. Sec3p como parte del complejo del exocisto marca los lugares de secreción polarizada reclutando las vesículas de secreción en lugares concretos de la célula. Tor2p, un sensor nutricional también señaliza a través de Rho1p y Pkc1p para controlar la reorganización del citoesqueleto de actina.

#### 4.4 Las proteínas “sensoras” y la ruta de integridad en *S. cerevisiae*

En *S. cerevisiae* se han identificado dos familias de proteínas de membrana que podrían ser los “sensores” que activan la ruta Pkc1p en respuesta a distintas condiciones de estrés: la familia Wsc formada por Slg1p/Wsc1p, Wsc2p y Wsc3p (Verna et al., 1997), y la familia Mid2p formada por el par Mid2p

y Mtl1p (Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999).

Estas familias de sensores se encuentran distribuidas uniformemente en la membrana plasmática y parece que responden a distintos estímulos, lo que se deduce por la diferente sensibilidad al estrés externo que presentan las cepas con mutaciones en estos genes (Reinoso-Martín

et al., 2003; Verna et al., 1997; Vilella et al., 2005). Una búsqueda utilizando los “arrays” de expresión disponibles en la base de *S. cerevisiae* (<http://www.yeastgenome.org/>), muestra que los genes *MID2*, *MTL1* y los genes *WSC* presentan distintos patrones de expresión, indicando que estos sensores median la señalización en condiciones diferentes. Además estos genes integran una red compleja de interacciones genéticas, como la interacción de letalidad sintética del mutante doble *wsc1Δ mid2Δ*; la exacerbación del fenotipo de los mutantes *wsc1Δ wsc2Δ*, *wsc1Δ wsc3Δ* y de *mid2Δ mtl1Δ*; y la supresión por *MID2* del fenotipo de *wsc1Δ* y de *wsc2Δ*. (Ketela et al., 1999; Rajavel et al., 1999; Verna et al., 1997). En conjunto, los datos indican que estos genes podrían estar desempeñando una serie de funciones, algunas distintas y otras parcialmente redundantes.

Los sensores caracterizados son proteínas transmembranales que poseen: 1) un péptido señal, 2) un ectodominio periplásmico rico en serinas y treoninas (STR), 3) un único dominio transmembrana, que conecta las proteínas con la larga región extracelular, y 4) un “pequeño” dominio citoplasmático en el extremo carboxilo terminal. Las regiones extracelulares están altamente O-manosiladas y esta modificación se cree que confiere rigidez a estas proteínas, pudiendo funcionar como antenas o detectores del estado de la pared (Philip and Levin, 2001). Cada uno de estos dominios es indispensable para la función “in vivo” del sensor (Lodder et al., 1999) Sin embargo, la naturaleza de la señal que detectan estas proteínas y cómo se transmite esta señal aún no se conocen.

Cuando se producen daños en la pared celular, los “sensores” activan a la GTPasa Rho1p reclutando a su GEF Rom2p a la membrana plasmática. (Philip and Levin, 2001). Este reclutamiento es inhibido por la fosforilación de ciertos residuos de serina en la cola citoplásmica de Wsc1p (Vay et al., 2004). En el caso de Mid2p la interacción de la cola citoplásmica de Rom2p parece estar regulada además por otro mediador Zeo1p (Green et al., 2003).

El dominio WSC es una región rica en cisteínas (también conocida como CRD “cistein rich domain”), y se ha encontrado en más de 80 proteínas a lo largo de la escala biológica (desde virus a células animales). Debido a su presencia en dos exoglucanasas fúngicas se piensa que podría interactuar con glucanos.

Recientemente se ha visto en el caso de Wsc1p que la mutación de una única cisteína del dominio CRD elimina la función del sensor. Este dominio podría mediar el agrupamiento de varias moléculas de “Wsc” en la superficie celular en respuesta a estrés, formando lo que se denomina un “sensosoma” (Heinisch et al., 2010b). Según estos datos, el dominio WSC podría funcionar como mediador de interacciones proteína-proteína, además de su función de unión a glucanos.

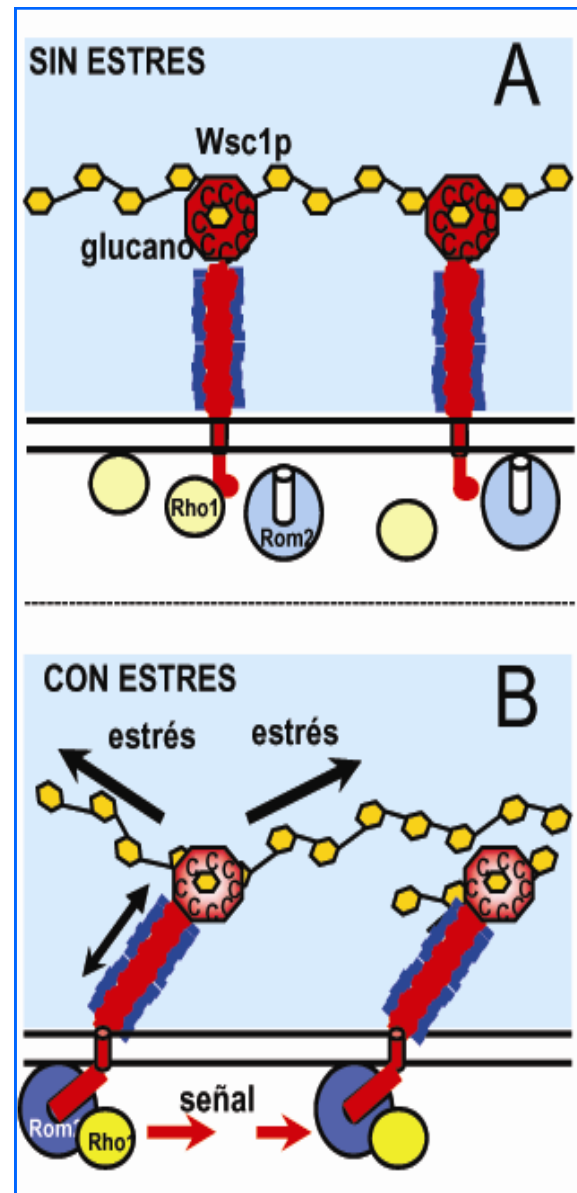
Los otros dos sensores, Mid2p y Mtl1p carecen del dominio WSC, sin embargo se ha visto que la función de Mid2p depende de una asparragina N-glicosilada cerca del extremo amino-terminal. Por comparación con el dominio WSC, esta zona podría funcionar como un “grupo de cabeza” que contacte con los glucanos (Hutzler et al.,

2008 ).

¿Por qué se llaman mecanosensores? Aunque no está totalmente demostrado, las características estructurales de estas proteínas son consistentes con su posible función como “mecanosensores”. El dominio transmembrana las ancla a la membrana plasmática mientras que la “cabeza” o dominio WSC permite una interacción dinámica con la pared celular. La región rica en serinas y treoninas adoptaría una estructura en forma de varilla, debida a la O-manosilación. La tensión producida en la membrana plasmática o en la pared celular generaría la fuerza mecánica en la parte extracelular del sensor, y los cambios de conformación inducidos en éste podrían ser transmitidos a la cola citoplásmica, permitiendo que se desencadene una respuesta celular (**figura 16**).

Recientemente, utilizando el microscopio de fuerza atómica, se han encontrado nuevas evidencias que podrían explicar un poco mejor este posible mecanismo de acción (Dupres et al., 2009; Heinisch et al., 2010a). Estas evidencias sugieren que la región rica en serinas y treoninas (STR) confiere al sensor la estructura de un “resorte”, con una “conexión rígida” entre el dominio transmembrana y el dominio WSC. De hecho, los autores han visto que un menor grado de manosilación o la inserción de glicinas no manosiladas en la región STR, elimina las propiedades del resorte (Dupres et al., 2009; Heinisch et al., 2010a).

¿Cual es la especificidad de estos sensores? ¿Cómo pueden reaccionar las células a diferentes tipos de señales si todos



**Figura 16: Posible mecanismo de acción de los sensores.** **A)** En ausencia de estrés el dominio Wsc interactúa con los glucanos. Los glucanos están representados por cadenas unidas por hexágonos naranjas. La unión al dominio Wsc debe ser pasajera para permitir el movimiento lateral del sensor en la pared y en la membrana plasmática. Al dominio Wsc le sigue el dominio rico en Serinas y Treoninas (STR, rojo) y las líneas en azul indican O-manosilación. A continuación viene un único dominio transmembrana (cilindro rojo) y la cola citoplásmica (curvada) que no es competente para activar a Rom2p y a Rho1p (círculos azul y amarillo, respectivamente). **B)** En presencia de estrés, los glucanos encojen haciendo presión sobre el resorte Wsc-STR. El cambio conformacional producido en el dominio citoplásmico del sensor (barra roja) ahora permite su interacción con Rom2p, que a su vez activa a Rho1p y señala a otros componentes de la ruta de integridad. (Tomado de Heinisch et al., 2010b. PLoS One).

los sensores confluyen hacia Rho1p y unos pocos componentes de la cascada de señalización? Puesto que hay varios sensores, sería de esperar desde el punto vista evolutivo que tuvieran diferentes especificidades o bien que regulasen diferentes procesos o que desempeñasen la misma función pero en un compartimento celular diferente.

En *S. cerevisiae*, Rho1p con al menos cuatro efectores (Pkc1p, Fks1p, Bni1p y Sec3p) y muchos pares de GAP-GEFs (ver Apartado 4.3), participa en multitud de procesos tales como la polarización celular, la síntesis de la pared celular y la secreción. Rho1p se encuentra en el centro de múltiples rutas de señalización y funciona como un integrador de señales. Por ejemplo, análisis de supresión indican que Mid2p y Wsc1p señalizan hacia Rho1p pero con diferentes vías de salida. Con Mid2p-activada, Rho1p señala hacia Pkc1p, mientras que la activación de Wsc1p estimula la actividad de Fks1 y de Pkc1p a la vez (Green et al., 2003; Sekiya-Kawasaki et al., 2002).

# ***OBJETIVOS***

## OBJETIVOS

El objetivo general de esta tesis ha sido la caracterización de nuevos componentes que actúen por encima de la ruta Rho1p/Pck1p/Pck2p que regula la integridad celular en *Schizosaccharomyces pombe*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

-Caracterizar las proteínas Mtl2p y Wsc1p de *S. pombe* que poseen una estructura similar a los “sensores” de *S. cerevisiae*.

-Estudiar el papel de estas proteínas (Mtl2p y Wsc1p) como posibles reguladores de la biosíntesis de la pared celular y de las rutas de señalización que responden a cambios en la misma.

# ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## 1. Microorganismos utilizados

En este trabajo el organismo mayoritariamente utilizado ha sido *Schizosaccharomyces pombe*. En la **Tabla I** que se presenta a continuación se detallan las cepas usadas así como su procedencia y

características genéticas.

Estas cepas de *S. pombe* se conservan en glicerol al 15% a  $-78^{\circ}\text{C}$ .

Para realizar los trabajos de clonación molecular se utilizaron también diferentes estirpes de *Escherichia coli*. Estas estirpes

**TABLA I: Estirpes empleadas en este trabajo**

Nombre	Genotipo	Procedencia
YS64	$h^{-}$ <i>leu1-32 his3D1 ura4D-18 ade6M210</i>	Colección YSM
MS176	$h^{-}$ 972	Colección YSM
YS 1215	$h^{+}$ <i>mtl2::his3<sup>+</sup> leu1-32 ura4D-18 ade6M210</i>	Colección YSM
YS 1220	$h^{-}$ <i>mtl2::his3<sup>+</sup> leu1-32 ura4D-18 ade6M210</i>	Colección YSM
GRG12	$h^{+}$ <i>ura4D18 his3D1 leu1-32 ade6M210 wsc1::kanMX6</i>	Colección YSM
GRG15	$h^{-}$ <i>ura4D18 his3D1 leu1-32 ade6M210 wsc1::kanMX6</i>	Colección YSM
SC-13	$h^{+}$ <i>spc1HA6H:ura4<sup>+</sup> leu1-32, his3D1, ura4D-18, ade6M210</i>	Colección YSM
SC-19	$h^{-}$ <i>mtl2::his3<sup>+</sup> pmk1-HA6h:ura4, ura4D-18, his3d1, leu1-32, ade6M</i>	Este trabajo
SC-24	$h^{-}$ <i>spc1-HA6h:ura4<sup>+</sup> wsc1::kanMX6, ura4D-18, his3D1, leu1-32</i>	Este trabajo
SC-30	$h^{-}$ <i>spc1-HA6h:ura4, mtl2::his3<sup>+</sup> ura4D-18, leu1-32, ade6M210</i>	Este trabajo
SC-33	$h^{-}$ <i>P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> leu1-32 ura4D-18 his3d ade6M210</i>	Colección YSM
SC-52	$h^{-}$ <i>mtl2::his3<sup>+</sup> rgf2::ura4<sup>+</sup> leu1-32 ura4D-18 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-58	$h^{-}$ <i>P81nmt1-mtl2<sup>+</sup>, ura4D18 leu1-32 aDe6M210</i>	Este trabajo
SC-82	$h^{+}$ <i>P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1::ura4<sup>+</sup> ade6M210 leu1-32</i>	Este trabajo
SC-90	<i>mtl2::kanMX6</i>	Este trabajo
SC-92	$h^{-}$ <i>mtl2::kanMX6 ura4d18 leu1-32 his3d1 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-94	$h^{-}$ <i>rho1HA leu1-32 his3D1 ade6M210</i>	Colección YSM
SC-98	$h^{-}$ <i>wsc1::kanMX6 rgf2::ura4 his3D1 ura4D-18 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-102	<i>P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> rho1HA his3D1 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-124	$h^{-}$ <i>mtl2::his3<sup>+</sup> rho1HA leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-125	$h^{-}$ <i>wsc1::kanMX6 rho1HA leu1-32 his3D1 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-130	$h^{-}$ <i>wsc1::his3<sup>+</sup> ura4D-18 leu1-32 his3D1 ade6M</i>	Este trabajo
SC-140	$h^{-}$ <i>wsc1::his3<sup>+</sup> pmk1HA6H:ura4 ura4D-18 leu1-32 ade6m210</i>	Este trabajo
SC-165	$h^{-}$ <i>wsc1::kanMX6 rgf1::his3<sup>+</sup> rgf1GFP:leu ura4D-18 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-167	<i>mtl2<sup>+</sup> GFP:ura4<sup>+</sup> his3D1 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-171	<i>P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1::kanMX6 pmk1HA6H:ura4</i> $h^{-}$ <i>rom1::ura4<sup>+</sup> 81XHArom1 leu1-32 his3D1</i> <i>ura4D-18 ade6M210</i>	Este trabajo
VT-88		
SC-175	<i>P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> mtl2::his3 ura4D-18 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-173	<i>P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> wsc1::kanMX6 his3D1</i>	Este trabajo
SC-196	<i>mtl2::kanMX6 GFPrgf3<sup>+</sup>:leu<sup>+</sup> rgf3::ura4<sup>+</sup></i>	Este trabajo
SC-198	<i>wsc1::kanMX6 GFPrgf3<sup>+</sup>:leu<sup>+</sup> rgf3::ura4<sup>+</sup></i>	Este trabajo
SC-200	<i>ehs2-1 mtl2::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo



**TABLA I: Estirpes empleadas en este trabajo (Continuación)**

Nombre	Genotipo	Procedencia
SC-203	<i>ehs2-1 wsc1::kanMX6 leu1-32</i>	Este trabajo
SC-217	<i>pREP3X wsc1HA his3D1 ura4D-18 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-228	<i>mtl2<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> his3D1 leu1-32 ade6M210 pAL rgf1-tomato</i>	Este trabajo
SC-230	<i>wsc1<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> his3D1 leu1-32 ade6M210 pAL rgf1-tomato</i>	Este trabajo
SC-236	<i>mtl2::kanMX6 rgf1::his3<sup>+</sup> rgf1GFP:leu<sup>+</sup></i>	Este trabajo
MS-264	<i>ehs2-1 leu1-32</i>	Colección YSM
GRG-42	<i>h<sup>-</sup> wsc1::wsc1GFP:ura4<sup>+</sup> leu1-32 his3D1 ura4D-18 ade6M210</i>	Colección YSM
GRG-18	<i>h<sup>+</sup> ura4D-18 his3D1 leu1-32 ade6M210 wsc1::ura4<sup>+</sup></i>	Colección YSM
GRG32=MI200	<i>h<sup>+</sup> ade6-M216 leu1-32 ura4D-18 pmk1-HA6h:ura4<sup>+</sup></i>	Colección YSM
VT-13	<i>h<sup>-</sup> rgf1::his3<sup>+</sup> his3D1 ura4D-18 leu1-32 ade6M210</i>	Colección YSM
PG-65	<i>h<sup>-</sup> rgf1::kanMX6 leu1-32 ura4D-18 ade6M210</i>	Colección YSM
PG-442	<i>h<sup>+</sup> tea4::kanMX6 leu1-32 ura4D-18 ade6M210</i>	Colección YSM
SC-252	<i>wsc1<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> tea4::kanMX6 leu1-32 ura4D-18 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-254	<i>mtl2<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> wsc1::kanMX6 his3D1 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-256	<i>wsc1<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> mtl2::kanMX6 his3D1 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
JCRsp962	<i>h<sup>+</sup> crn1<sup>+</sup>GFP:kanMX6 ade6M210 leu1-32 ura4D-18</i>	Colección YSM
VT-20	<i>rho2::ura4<sup>+</sup>, leu1-32, ade6M210</i>	Colección YSM
VT-81	<i>h<sup>+</sup> rho1::ura4<sup>+</sup> pREP41X-rho1<sup>+</sup></i>	Colección PPG
PG318	<i>pmk1-HA6h:ura4<sup>+</sup> mkh1::ura4<sup>+</sup> ade6M216 ura4D-18 leu1-32</i>	Colección YSM
PG-285	<i>rgf1::kanMX6 pmk1-HA6H:ura4<sup>+</sup></i>	Colección YSM
PG-327	<i>h<sup>+</sup> rgf1::kanMX6 ura4D-18 leu1-32 his3D1</i>	Colección YSM
SC-240	<i>wsc1<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> aur-cherry Atb2</i>	Este trabajo
SC-242	<i>mtl2<sup>+</sup>GFP:ura4<sup>+</sup> aur-cherry Atb2</i>	Este trabajo
SC-233	<i>h<sup>+</sup> aur-cherry Atb2 ura4D-18</i>	Colección YSM
SC-257	<i>rho2::ura4<sup>+</sup> wsc1::kanMX6 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-258	<i>rho2::ura4<sup>+</sup> wsc1::kanMX6 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-259	<i>rho2::ura4<sup>+</sup> mtl2::kanMX6 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo
SC-260	<i>rho2::ura4<sup>+</sup> mtl2::kanMX6 leu1-32 ade6M210</i>	Este trabajo

se recogen en la **Tabla II**.

## 2. Medios de cultivo

### 2.1 Medios de cultivo para *S. pombe*

Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento y mantenimiento de *S. pombe* son los descritos por (Moreno et al., 1991).

Medio rico (YES), medio mínimo (EMM o MM) y medio de esporulación (MEA).

El MM se preparó como se describe en el recuadro adjunto. Al MM completo se le añadieron los suplementos adenina, leucina, uracilo, histidina y lisina, cada uno de ellos a una concentración final de 225 mg/l. Cuando había que seleccionar estirpes diploides y/o mantener la presión selectiva en el caso de estirpes transformadas con

**TABLA II : Cepas de *Escherichia coli* empleadas en este trabajo.**

Nombre	Marcadores genéticos	Origen
MAX DH5 $\alpha$	F- $\phi$ 80dlacZ $\Delta$ M 15, $\Delta$ (lacZYA-argF)U169, deoR, recA1, endA1, hsdR17(r <sub>k</sub> <sup>-</sup> , m <sub>k</sub> <sup>+</sup> ), phoA, supE44, I <sup>-</sup> , thi-1, gyrA96, relA1	Life Technologies
CJ236	F', cat(=pCJ105 ; M13 <sup>S</sup> Cm <sup>R</sup> )/dut, ung 1, thi-1, relA 1, spoT 1, mcrA	Bio Rad

### Medio YE (Yeast Extract)

Extracto de levadura 5g/l 0,5% (p/v)  
 Glucosa 30g/l 3% (p/v)  
 Suplementos: adenina, 225mg/l  
 histidina, leucina, lisina y uracilo

Utilizado para el crecimiento vegetativo, inhibe la conjugación y la esporulación.

plásmidos, se eliminó del medio el/los suplementos correspondientes.

El medio de esporulación MEA se prepara con todos los suplementos excepto lisina.

Para preparar los medios (YES o MM) suplementados con Equinocandina B (*Ely Lilly*), (Radding et al., 1998), el antifúngico se añadió al medio esterilizado previamente.

### Edinburgh Minimal Medium (EMM) o Medio Mínimo (MM)

Biftalato potásico 3 g/l  
 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 5 g/l  
 Glucosa 2%

Sales, vitaminas y minerales.

Utilizado para el crecimiento vegetativo.

Para preparar medio YES suplementado con Calcoflúor (*Blancophor BBH, Bayer Corporation*), el medio se tamponó con biftalato potásico 50 mM a pH 6,2, para evitar la precipitación del antifúngico. El Calcoflúor se añadió al medio esterilizado previamente.

Los medios suplementados con sorbitol se prepararon añadiendo éste a una concentración final de 1,2 M.

### MEA (Malt Extract Agar)

Extracto de malta 30g/l 3%(p/v)  
 Bacto-agar 20g/l 2%(p/v)  
 Suplementos: adenina, 225mg/l  
 histidina, leucina, lisina y uracilo

Utilizado para la inducción de la esporulación en las células de *S. pombe*.

La represión de los genes controlados por el promotor *nmt1* se realizó añadiendo tiamina al MM a una concentración final de 15  $\mu$ g/ml. Para inducir la expresión de los genes regulados por este promotor las células se lavaron 4 veces con agua estéril y se resuspendieron en medio fresco sin tiamina. Los medios sólidos se prepararon añadiendo agar al 2% a los medios anteriormente

descritos.

## 2.2 Medios de cultivo para *E. coli*

Los medios empleados para el cultivo de *E. coli* fueron:

### 2xYT

Bactotripton	16g/l	1,6%(p/v)
Extracto de levadura	10g/l	1%(p/v)
NaCl	10g/l	1%(p/v)

Se usa para el crecimiento vegetativo de *E. coli*.

### LB (Luria-Bertani Medium)

Bactotripton	10g/l	1%(p/v)
Extracto de levadura	5g/l	0,5%(p/v)
NaCl	10g/l	1%(p/v)

Se usa para el crecimiento vegetativo de *E. coli*.

Para seleccionar clones bacterianos resistentes a antibióticos, los medios de *E. coli* se suplementaron con Ampicilina (100  $\mu$ g/ml) o Kanamicina (30  $\mu$ g/ml). Los medios sólidos se prepararon con agar al 2%.

Todos los medios de cultivo fueron preparados con agua destilada (Milli-Rho) y esterilizados por calor en el autoclave.

## 3. Condiciones y estimación del crecimiento

### 3.1 Condiciones de crecimiento para *S. pombe*

Para conseguir cultivos de *S. pombe* en crecimiento exponencial, se seleccionaron colonias aisladas, cuyas características genéticas se habían comprobado anteriormente, y con ellas se inocularon de 3 a 5 ml de medio YES (medio YE con suplementos) o MM. Las células crecían a la temperatura apropiada hasta que entraban en fase estacionaria temprana. A continuación, se inoculaba con este cultivo otro mayor, teniendo en cuenta el tiempo de generación de la levadura en cada medio de cultivo.

Todas las placas y matraces se incubaron a 28°C, de no indicarse lo contrario. Para que la aireación sea la adecuada, los cultivos líquidos se mantuvieron con una agitación de 150-250 rpm y el volumen del cultivo nunca superó 1/5 del volumen del matraz.

El crecimiento de la levadura en medio líquido se controló midiendo la turbidez del cultivo por absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro y recurriendo a tablas de calibración obtenidas previamente. Según estas tablas una densidad óptica de 1 se corresponde aproximadamente con  $10^7$  células/ml.

Cuando fue necesario se determinó el número de células mediante recuento directo con cámara Thoma.

El mantenimiento de las cepas se realizó por resiembra en placas de medio

sólido, que se conservaron a 4°C entre 30 y 40 días.

### 3.2 Condiciones de crecimiento para *E. coli*

*E. coli* se incubó a 37°C, tanto en placa como en medio líquido, usando un agitador a 250 rpm en este último caso. Las cepas de *E. coli* se conservan a -78°C en viales con glicerol al 50%.

## 4. Técnicas de clonación molecular

### 4.1 Obtención de ADN

La extracción de ADN plasmídico a partir de bacterias se realizó usando el método de la lisis alcalina, (Zhou et al., 1990), en el que las células se rompen en presencia de una mezcla de NaOH y dodecil sulfato sódico (SDS). El ADN es precipitado posteriormente con etanol. Cuando se necesitó ADN de mayor pureza o concentración, se utilizaron los "Kit" *Wizard Plus SV Minipreps DNA purification System* o *Wizard Plus Midipreps DNA purification System* de *Promega*, en función de la cantidad de ADN que fuese necesaria.

Para la obtención de ADN plasmídico y genómico de *S. pombe* se siguieron los protocolos descritos por (Moreno et al., 1991).

### 4.2 Tratamientos enzimáticos del ADN

Todos los protocolos usados para

manipular el ADN se recogen en publicaciones de (Ausubel et al., 1995; Sambrook and Russell, 2001), teniendo en cuenta las recomendaciones de los diferentes proveedores (*Roche, Amersham, Promega, ..etc*).

Los principales tratamientos enzimáticos realizados fueron los siguientes:

-Digestiones con endonucleasas de restricción.

-Ligación mediante la enzima ADN ligasa del fago T4.

-Creación de extremos romos utilizando: el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli* y la DNA polimerasa del fago T4.

-Fosforilación del extremo 3' de oligonucleótidos con la polinucleótido quinasa del fago T4.

### 4.3 Electroforesis del ADN en geles de agarosa

El análisis de los fragmentos de ADN obtenidos por tratamiento con enzimas de restricción o amplificación por PCR se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de agarosa (*agarosa D-1, Pronadisa*) preparados a una concentración variable entre 0,8% y 1,5% según el tamaño esperado de las bandas. Los geles se prepararon con tampón 1x TAE (Tris-acético 40 mM, EDTA 2 mM, pH 7,5-7,8) y se añadió el agente intercalante bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml para poder ver los fragmentos de ADN bajo luz ultravioleta.

Para el aislamiento y purificación de los fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa se utilizó el sistema GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit suministrado por Amersham Biosciences.

#### 4.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR se llevó a cabo en un termociclador Bio Rad Gene Cycler™.

Dependiendo de la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de los cebadores empleados y del tamaño del producto esperado, se realizaron modificaciones sobre el siguiente protocolo estándar de reacción:

-Desnaturalización inicial  
10 minutos a 90°C

-30 ciclos de :

- Desnaturalización del ADN  
1 minuto a 90°C
- Anillamiento 1 minuto a 55°C
- Extensión 5 minutos a 72°C

-Extensión final 10 minutos a 72°C

Las mezclas de reacción contenían ADN molde en cantidad variable según fuese ADN plasmídico o genómico, además de: mezcla de dNTPs (dATP, dTTP, dGTP, dCTP, cada uno a una concentración final de 200µM), los dos oligonucleótidos cebadores (1µM cada uno), MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, Taq polimerasa (*EcoTaq*™) 0,25 unidades y el tampón de reacción suministrado con la

enzima.

En las reacciones de amplificación se utilizaron temperaturas de anillamiento entre 3 y 5 grados por debajo de la del cebador que tuviese una T<sub>m</sub> más baja.

Los fragmentos de ADN obtenidos por PCR se emplearon posteriormente para clonación molecular y se ligaron en el plásmido pGEM-T (ver apartado 4.8.1).

Los oligonucleótidos empleados en este trabajo fueron suministrados por Isogen o Thermo y sus secuencias y utilidad se describen en la **Tabla III**.

#### 4.5 Secuenciación de ácidos nucleicos

La técnica usada se basa en la descrita por (Sanger et al., 1977), pero en este caso se emplearon didesoxinucleótidos marcados con fluorocromos y un láser capaz de reconocer los distintos colores (longitud de onda de emisión) de los fluorocromos que corresponden a cada una de las bases del DNA. Se utilizó un secuenciador *ABI 377* (*Applied Biosystems*). Las secuencias se importaron mediante el programa *Chromas*, que muestra el cromatograma de la reacción y la secuencia de DNA correspondiente.

El fundamento de este sistema es una reacción de PCR en la cual la extensión enzimática de una cadena de DNA a partir de un oligonucleótido iniciador, empleando

TABLA III: Oligonucleótidos empleados en este trabajo.

NOMBRE	SECUENCIA	UTILIDAD
<b>PCR</b>		
WSC1 comprobación 5'	5'-CGT GGG TAC TTC GAC ATG-3'	Comprobación de la interrupción de <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
Mid 2 externo	5'-GTT GCT CTT ATC CGT TG-3'	Comprobación de la interrupción de <i>mtl2</i> <sup>+</sup> .
Rom2-3'ext	5'-CAA GGG TAT GTG GTC TGG-3'	Comprobación de la interrupción de <i>rgf1</i> <sup>+</sup> .
Rom3-ext-3'	5'-GAG ACG GTA AAA TCA CG-3'	Comprobación de la interrupción de <i>rgf2</i> <sup>+</sup> .
IPCR-M-b <sup>+</sup>	5'-CAC CAT GCC AAA AAT TAC ACA AGA TAG AAT-3'	Comprobación de la interrupción de <i>rgf2</i> <sup>+</sup> .
M22	5'-GTG TTC GCT AAT TGC GC-3'	Comprobación de la interrupción de <i>mtl2</i> <sup>+</sup> y <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
M13	5'-CTG GTG GCC TTA GGT-3'	Comprobación de la interrupción de <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
Kan 3	5'-CGG ATT CAG TCG TCA CTC ATG GTG-3'	Comprobación de la interrupción de <i>mtl2</i> <sup>+</sup> y <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
HA p28	5'-ATG GCT TAC CCA TAC GAT GTT CC-3'	Comprobación <i>rho1HA</i> .
VT4	5'-GGC TCC AAG AGG TAA AGA C-3'	Comprobación <i>rho1HA</i> .
KpnI-Wsc1 FW 5'	5'-GGT ACC GCT ATG GGC ATA CTG CAG-3'	Amplificación de la región 5' de <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
Sal I-Wsc1 RV 5'	5'-GTC GAC TCC CCT TAA AGG GAG AGG-3'	Amplificación de la región 5' de <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
WSC ORF3'	5'-TAA TCC TGA CTG TCA GCC-3'	Amplificar ORF <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
WSC ORF5'	5'-CCT ATT ATA CTT ACG CAC G-3'	Amplificar ORF <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
Mid2-RV	5'-CT GCT TGC CGG AAT ACT GCT AGA AGC AGA TGA GCT GAC GGA AGT GTC CAC ACT TGA AGT ATT GTT CGT GAA TGA CAT TTT- CAT GAT TTA ACA AAG CGA CTA TA-3'	Construcción <i>P8Inmt1-mtl2</i> <sup>+</sup> .
Mid2-Fw	5'-CAT CTT TTG TGT GAA GCT ATG GTG TCT TGA AAC ATTGCG AAA CAT AAG GAC TTT GCT TCA TGC AAT TCT GGG CCT CTC- GAA TTC GAG CTC GTT TAA AC-3'	Construcción <i>P8Inmt1-mtl2</i> <sup>+</sup> .
<b>SECUENCIACIÓN</b>		
WSC SEC1	5'-CGG TTT GCG CCT TTT GA-3'	Secuenciar ORF <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
WSC SEC2	5'-GGT GGT GAT CTG TAC TGG-3'	Secuenciar ORF <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
WSC SEC3	5'-GTT CCA AGC AGT ACG GC-3'	Secuenciar ORF <i>wsc1</i> <sup>+</sup> .
<b>MUTAGÉNESIS</b>		
WSC1-XhoI	5'-GGA ATT TAA AAA GAC CAT GGA <u>CTC GAG</u> AAT TAA ATC GTG CGT AAG-3'	Introducir un sitio <i>XhoI</i> en codón anterior al ATG.
WSC1-SmaI	5'-GGT TTA ACA CAT ATT GAA <u>CCC GGG</u> AAC AAA TCC AGT TTC CCG-3'	Introducir un sitio <i>SmaI</i> después del codón de parada.
Mtl2-Not (A)	5'-GAA GTA TTG TTC GTC AAT <u>GAG CGG CCG CGC</u> ATT TTC TCT TGC GTG CG-3'	Introducir un sitio <i>NotI</i> en el extremo amino.
Mtl2-Not (C)	5'-GTG TTT AAG CGC ATA CTT TAG <u>CGG CCG CGA AAC</u> AGG TTC AAC CTG CG-3'	Introducir un sitio <i>NotI</i> en el extremo carboxilo.
Mtl2-Sal-5	5'-GTA TTG TTC GTG <u>GTC GAC</u> ATG TCG ACC TCT TGC GTG CGA ATT CC-3'	Introducir un sitio <i>SalI</i> anterior al ATG.
Mtl2-Sma-3	5'-GGA AAT GAG TGA GTA ACG <u>CCC GGG</u> GTA AAA CAA AGA GAT AGC-3'	Introducir un sitio <i>SmaI</i> justo después del codón de parada.
Los sitios de restricción introducidos se señalan subrayados.		

DNA bicatenario como molde, es interrumpida por la incorporación de didesoxinucleótidos.

#### 4.6 Mutagénesis dirigida

Se utilizó el sistema *Muta Gene Fagemid* de *Bio Rad*, que se basa en el método descrito por Kunkel, 1985. Para la mutagénesis empleamos la cepa CJ236 de *E. coli* que cuenta con:

-El episoma F', que le permite ser infectada por el fago auxiliar M13K07.

-La mutación *dut*, que inactiva la enzima dUTPasa. Al aparecer elevados niveles intracelulares de dUTP, las moléculas de ADN sintetizadas portan uracilo en los lugares donde debiera aparecer timina.

-La mutación *ung*, que inactiva la uracilo N-glicosilasa, así el uracilo incorporado al ADN no puede ser eliminado.

Para llevar a cabo las reacciones de mutagénesis se emplearon los oligonucleótidos cebadores recogidos en la **Tabla III** y se siguieron los siguientes pasos:

-La estirpe CJ236 se transformó con el ADN bicatenario que se pretende mutagenizar y se inoculó medio 2xYT líquido.

-Se infectaron las colonias resultantes con el fago M13K07.

-Se recuperaron las moléculas de ADN de cadena sencilla contenidas en los fagos.

-Estas cadenas ricas en uracilo se

usaron como molde para sintetizar *in vitro* las hebras complementarias. El cebador empleado fue el oligonucleótido que contenía la mutación que queríamos introducir.

-Se transformó las cepa DH5 $\alpha$  con el ADN bicatenario. DH5 $\alpha$  no es mutante *ung* e inactiva la hebra rica en uracilo del ADN, replicando sólo la hebra sin uracilo, que es la portadora de la mutación.

#### 4.7 Gap repair

La técnica de “*gap repair*” ó reparación del hueco, se emplea como método de clonación de genes y para el mapeo de mutaciones en un gen dado (Orr-Weaver et al., 1991). Básicamente consiste en construir un plásmido que contenga un marcador de selección para levaduras entre las regiones flanqueantes de la secuencia a rescatar. Este plásmido se lineariza de forma que las regiones flanqueantes del gen queden en los extremos. Posteriormente se transforma la cepa de *S. pombe* con el plásmido linearizado. Mediante recombinación de los extremos del plásmido con las regiones homólogas presentes en el genoma, la copia cromosomal se introduce en el plásmido, que solo entonces se puede recircularizar y propagar de manera autónoma.

El plásmido se recupera a partir de aquellos transformantes que son inestables (que son los que no han integrado el plásmido). Se obtiene DNA total y se transforma *E. coli* tal y como se describe en el apartado **4.12**.



## 4. 8 Vectores utilizados

### 4.8.1. Vectores de *E. coli*

#### pBluescript II SK<sup>+</sup> (*Stratagene*)

Es un plásmido autorreplicativo de 2,958 kb, en cuya secuencia se encuentra:

-El origen de replicación relajada colE1 (ori).

-El gen de resistencia al antibiótico ampicilina, (amp<sup>R</sup>).

-Un fragmento del operón lactosa de *E. coli* que codifica el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa (Lac Z').

-21 sitios de restricción reconocidos por endonucleasas específicas, insertados en la fase de lectura del péptido alfa, sin alterarla.

-Los promotores de las ARN polimerasas T3 y T7 que flanquean el fragmento de ADN portador del sitio de clonación múltiple y que pueden utilizarse para la síntesis de ARN *in vitro*.

-Un fragmento de la región intergénica del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la replicación y el empaquetamiento de ADN, que hace posible que de estos vectores pueda recuperarse ADN monocatenario una vez infectada una población de células adecuada, portadora de alguno de estos plásmidos con el fago modificado M13K07.

Se utilizaron los siguientes plásmidos derivados de éste:

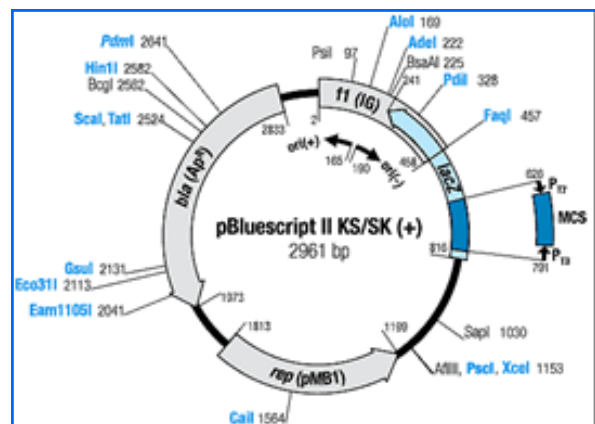


Figura 17. Mapa genético del vector de *E. coli* pBluescript II SK<sup>+</sup>.

**-SK-His:** es el vector SK (Bluescript II SK<sup>+</sup>) que contiene el gen *his3*<sup>+</sup> de *S. pombe* insertado en los sitios de restricción *EcoRV* y *PstI* del sitio de clonación múltiple.

**-SK-Ura:** idéntico al vector SK pero con el gen *ura4*<sup>+</sup> de *S. pombe* insertado en los sitios de restricción *HindIII* y *PstI* del sitio de clonación múltiple.

**-KS-kan:** vector KS (Bluescript II KS<sup>+</sup>) con el gen de la resistencia a la kanamicina insertado en los sitios de restricción *BamHI* y *EcoRI* del sitio de clonación múltiple.

#### pGem-T (*Promega*)

Es un vector de 3 kb derivado del plásmido pGEM-5f(+). Contiene 13 sitios de reconocimiento únicos para enzimas de restricción y se comercializa linealizado con una timidina adicional en los extremos que facilita la inserción de fragmentos generados por PCR. Al igual que el vector pBluescript II SK<sup>+</sup> permite la selección de clones recombinantes por alfa complementación (azul-blanco).



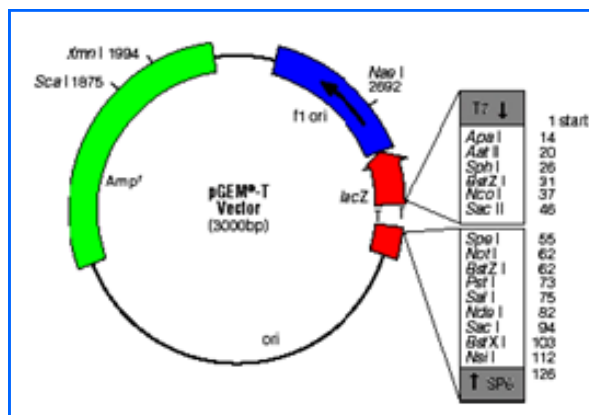


Figura 18: Mapa genético del vector de *E. coli*, para la clonación de secuencias obtenidas por PCR, pGem-T.

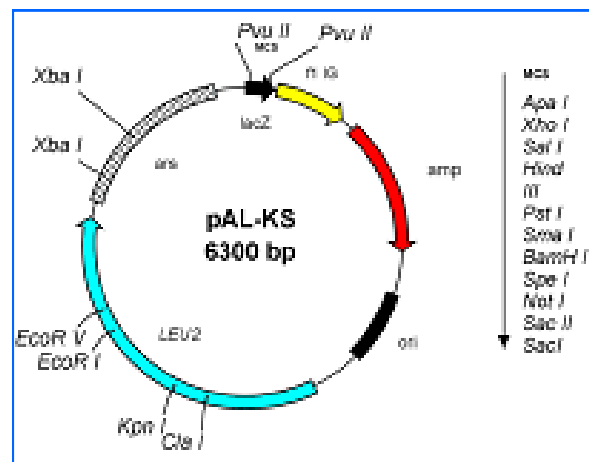


Figura 19: Mapa genético del vector de *S. pombe* pAL-KS.

### 4.8.2. Vectores de levadura

#### pAL-KS<sup>+</sup>

Este vector tiene 6,3 kb, obtenido por el Dr. J. Ishiguro (Konan University, Japón) a partir del plásmido pBuescript II KS<sup>+</sup> (Stratagene) al que se le han añadido:

- Un fragmento de ADN que incluye sitios de reconocimiento para 11 endonucleasas de restricción, en la región estructural del gen que codifica el péptido  $\alpha$  de la  $\beta$ -galactosidasa.

- El origen de replicación de *S. pombe*, *arsI*<sup>+</sup>, que contribuye a aumentar la frecuencia de transformación y a reducir el número de copias del plásmido por célula.

- El gen *LEU2* de *S. cerevisiae* capaz de complementar la mutación *leu1* de *S. pombe*, aunque las estirpes presentan crecimiento lento en los casos en que este marcador se halla en una sola copia.

#### pAU-KS

Este vector tiene 6,5 kb y posee los mismos elementos que pAL-KS, excepto el marcador *LEU2*, que ha sido sustituido por el gen *URA4* de *S. cerevisiae* capaz de complementar la mutación *ura4* de *S. pombe*.

#### pREP

Construido a partir del vector de *E. coli* pUC119. Poseen el origen de replicación (*ori*) y el marcador de selección (*amp*<sup>R</sup>) de *E. coli*, así como el origen de replicación del fago *f1* y la secuencia *arsI*<sup>+</sup> de *S. pombe*.

La utilidad de esta familia de vectores reside en que cuentan con la secuencia del promotor del gen *nmt1*<sup>+</sup> (*no message in Thiamine*) seguida de un sitio de clonación múltiple, que permite sobreexpresar los insertos clonados en los plásmidos pREP si las células crecen en un medio sin tiamina, o reprimir su expresión añadiendo tiamina a los medios.

Los vectores denominados con número impar (pREP3X, pREP41X y pREP81X) llevan el gen *LEU2* como marcador de

selección. Los de número par (pREP4X, pREP42X y pREP82X) llevan el gen *URA4* como marcador de selección.

El promotor *nmt1* original se modificó de forma que produce un nivel de expresión alto (pREP3X y pREP4X), medio (pREP41X y pREP42X), o bajo (pREP81X y pREP82X) (Basi et al., 1993; Maundrell, 1993).

La doctora Pilar Pérez nos proporcionó los plásmidos de sobreexpresión p3X-*rho1*<sup>+</sup>, p3X-*rho2*<sup>+</sup>, p3X-*rho3*<sup>+</sup>, p3X-*rho4*<sup>+</sup>, p3X-*rho5*<sup>+</sup>, p3X-*cdc42*<sup>+</sup>, p41X-*rho1*<sup>+</sup>, p41X-*rho2*<sup>+</sup>, p41X-*rho3*<sup>+</sup>, p41X-*rho4*<sup>+</sup>, p41X-*rho5*<sup>+</sup>, y p41X-*cdc42*<sup>+</sup>. Estos plásmidos contienen la ORF correspondiente a cada una de las GTPasas *rho1*<sup>+</sup>, *rho2*<sup>+</sup>, *rho3*<sup>+</sup>, *rho4*<sup>+</sup>, *rho5*<sup>+</sup> y *cdc42*<sup>+</sup> bajo el control del promotor *nmt1* en un vector pREP3X o pREP41X (Calonge et al., 2003).

### pJK-148

Es un vector de 5,3 kb que lleva el gen *leu1*<sup>+</sup> de *S. pombe* como marcador de selección y carece de secuencias *arsI*<sup>+</sup>, por lo que no se replica de manera autónoma. Se utiliza para la integración de secuencias de DNA en el genoma de *S. pombe*.

La integración se realiza normalmente digiriendo el plásmido con una enzima que corta dentro del gen *leu1*<sup>+</sup>. El plásmido linealizado se introduce en una cepa con la mutación *leu1-32* de modo que en el genoma de *S. pombe* se reconstituyen dos genes *leu1*, uno mutado y el otro silvestre, y se recupera así la capacidad para crecer en medio sin leucina. Este plásmido descrito por (Keeney and Boeke, 1994), posee además:

-Un fragmento de DNA que incluye sitios de reconocimiento para 19 endonucleasas de restricción.

-El marcador de selección amp<sup>R</sup>

-Un fragmento de la región intergénica del fago f1 que codifica las funciones requeridas para la obtención de DNA monocatenario.

-(ori) origen de replicación en bacterias.

-(*lacZ*) gen de la β-galactosidasa para la selección de clones por blanco-azul.

### 4.8.3 Vectores construidos en este trabajo

-**pFM2:** Vector SK-His que contiene 1,4 kb de la región promotora del gen *mtl2*<sup>+</sup> entre los sitios *ApaI-SalI* y 1,2 kb de la región terminadora entre los sitios *PstI-NotI*.

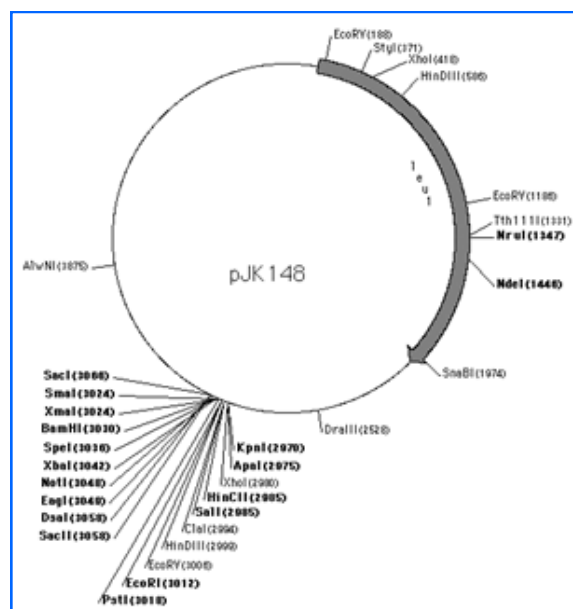


Figura 20: Mapa genético del vector de *S. pombe* pJK-148.

**-pCL5:** vector SK-Ura con 1 kb de la región promotora del gen *wsc1*<sup>+</sup> entre los sitios *XhoI-HinDIII* y 1 kb de la región terminadora entre los sitios *BamHI-NotI*.

**-pSC2:** obtenido por la técnica de gap-repair, partimos de un plásmido pAL-KS donde se ha insertado el gen *mtl2*<sup>+</sup> completo, con su extremo 5' *ApaI-SalI* y su extremo 3' *PstI-NotI*.

**-pCL10:** vector pAL que lleva la ORF del gen *wsc1*<sup>+</sup> con su región promotora y terminadora, entre los sitios *XhoI/NotI*.

**-pSC3:** plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC2) con el sitio *NotI* eliminado de la secuencia de clonación múltiple.

**-pSC4:** obtenido del plásmido pSC3, con el sitio *NotI* introducido por mutagénesis en el extremo amino terminal.

**-pSC5:** obtenido del plásmido pSC3 con el sitio *NotI* introducido por mutagénesis en el extremo carboxi terminal.

**-pSC6:** plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC4) con la secuencia de la GFP, seguida de una cola con 8 alaninas, en el sitio *NotI* introducido por mutagénesis en el extremo amino.

**-pSC7:** plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC5) con la secuencia de la GFP en el sitio *NotI* introducido por mutagénesis en el extremo carboxilo.

**-pSC8:** plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC4) al que se añadió en fase, en el extremo amino terminal, el epítipo inmunoreactivo HA.

**-pSC9:** plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC5) al que se añadió en fase en el extremo carboxi terminal el epítipo inmunoreactivo HA.

**-pSC10:** vector pREP con el promotor nmt1 3X con la ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> desde el sitio *Sal I* (introducido por mutagénesis) en el ATG al sitio *Sma I* (introducido por mutagénesis) al final del gen.

**-pSC11:** vector pREP con el promotor nmt1 41X con la ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> entre los sitios *XhoI-SmaI* (introducido por mutagénesis).

**-pSC 12:** vector pREP con el promotor nmt1 81X con la ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> entre los sitios *XhoI-SmaI* (introducido por mutagénesis).

**-pRZ16:** vector pREP3X en el que se ha clonado la ORF del gen *wsc1*<sup>+</sup> entre los sitios *XhoI/SmaI*.

**-pRZ17:** vector pREP81X en el que se ha clonado la ORF del gen *wsc1*<sup>+</sup> entre los sitios *XhoI/SmaI*.

**-pSC 13:** vector KS que lleva el gen de resistencia a kanamicina, kanMX6, (*EcoRI-BamHI*), también lleva el fragmento 5' del gen *mtl2*<sup>+</sup> entre los sitios *ApaI-SalI* y el fragmento 3' entre los sitios *PstI-NotI* e introducido en el sitio de clonación múltiple entre *SacII-SpeI*.

**-pSC14:** plásmido pAL- *mtl2*<sup>+</sup> marcado con GFP en el extremo carboxi terminal (pSC7) con un sitio *SmaI* introducido por mutagénesis.

**-pSC15:** plásmido pAL- *mtl2*<sup>+</sup>

marcado con HA en el extremo amino terminal (pSC8) con un sitio *SmaI* introducido por mutagénesis.

**-pSC16:** obtenido del plásmido pSC14, del cual se sacó el fragmento *KpnI-SmaI* (ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> marcado con GFP en el extremo carboxi terminal) y se integró en el vector pIJ.

**-pSC17:** obtenido del plásmido pSC15, del cual se sacó el fragmento *KpnI-SmaI* (ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> marcado con HA en el extremo amino terminal) y se integró en el vector pIJ.

**-pSC18:** vector SK-his con los fragmentos 5' (*KpnI-SalI* amplificado por PCR y clonado en el pGem-T) y 3' (*BamHI-NotI*) del gen *wscI*<sup>+</sup>.

**-pSC19:** obtenido del plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> marcado con GFP en el extremo carboxi terminal (PSC14) donde se introdujo el gen *ura4*<sup>+</sup> entre los sitios *SmaI-HincII* como marcador de selección.

**-pSC20:** vector pJCR-L3X digerido con las enzimas de restricción *NcoI-SmaI* donde se insertó la ORF del gen *wscI*<sup>+</sup> marcada con el epítipo HA, obtenida del plásmido pRZ12 digerido con las enzimas *NcoI-EcoRV* (3x*wscI*<sup>+</sup>HA).

**pSC21:** vector pREP con el promotor nmt1 81X y con la ORF del gen *wscI*<sup>+</sup> (pRZ17), digerido con las enzimas *PstI-SacI* para sacar un fragmento de 3,5 Kb que lleva la región promotora con la ORF del gen *wscI*<sup>+</sup> y la región terminadora, e integrado en pIJ entre los sitios *PstI-SacI*.

**-pCL9:** plásmido pCL5 en el que se ha insertado la ORF del gen *wscI*<sup>+</sup> entre los sitios *NcoI-BamHI*.

**-pCL12:** plásmido pCL10 (pAL-*wscI*<sup>+</sup>) al que se le ha eliminado el sitio *NotI* de la secuencia de clonación múltiple.

**pCL14:** plásmido pCL12 al que se le ha introducido por mutagénesis un sitio *NotI* en el extremo 3'.

**-pCL15:** plásmido pCL14 al que se le ha insertado la GFP en el sitio *NotI* introducido por mutagénesis.

**-pRZ1:** plásmido SK con el marcador *ura4*<sup>+</sup> que lleva el fragmento 5' de *wscI*<sup>+</sup> entre los sitios *XhoI-HindIII* y el fragmento 3' entre los sitios *BamHI-NotI*.

**-pRZ3:** plásmido pRZ1 en el que se ha sustituido el marcador de selección *ura4*<sup>+</sup> por el gen de resistencia a la kanamicina (kanMX6).

**-PRZ12:** plásmido pCL14 al que se le ha insertado en el sitio *NotI* del extremo carboxilo 3 copias del HA (pAL-*wscI*<sup>+</sup>HA).

**-pRZ20:** plásmido pAL-*wscI*<sup>+</sup> con un sitio *SmaI* metido por mutagénesis, aproximadamente a 200 (pb) después del final del gen.

**-pRZ21:** plásmido pRZ20 en el que clonamos el gen *ura4*<sup>+</sup> en el sitio *SmaI* introducido por mutagénesis.

## 4.9 Sobreexpresión de *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>

La sobreexpresión de los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> se realizó por clonación de la ORF en los distintos plásmidos de expresión pREP, con distintos niveles de expresión.

***mtl2*<sup>+</sup>:** En primer lugar diseñamos oligonucleótidos para introducir por mutagénesis los sitios de restricción *SalI* (antes del codón ATG) y *SmaI* (justo después del codón de fin de la traducción) en el plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (Tabla III de Materiales y Métodos). A partir de esta construcción y cortando con las enzimas (*SalI* y *SmaI*) pudimos obtener la fase de lectura completa del gen *mtl2*<sup>+</sup> y la clonamos en los mismos sitios del vector de sobreexpresión pREP3X (alto nivel de expresión), obteniendo el plásmido de sobreexpresión pSC10 (pREP3X-*mtl2*<sup>+</sup>). De forma similar obtuvimos los plásmidos pSC11 (pREP41X-*mtl2*<sup>+</sup>) (nivel medio de expresión) y pSC12 (pREP81X-*mtl2*<sup>+</sup>) (nivel bajo de expresión). En ambos casos la fase de lectura completa del gen *mtl2*<sup>+</sup> se obtuvo a partir del plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> digiriendo el ADN con *XhoI* y *SmaI* para clonarla en los mismos sitios de restricción del vector de sobreexpresión pREP41X y pREP81X respectivamente.

***wsc1*<sup>+</sup>:** Diseñamos oligonucleótidos para introducir por mutagénesis los sitios de restricción *XhoI* (en el codón anterior al ATG de inicio de la traducción) y un sitio *SmaI* (justo después del codón de fin de la traducción) en el plásmido pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (Tabla III de Materiales y Métodos). A partir de esta construcción y cortando con las enzimas (*XhoI* y *SmaI*) pudimos obtener la fase de lectura completa del gen *wsc1*<sup>+</sup> y la

clonamos en los mismos sitios de restricción del vector de sobreexpresión pREP3X, obteniendo el plásmido de sobreexpresión pRZ16 (pREP3X-*wsc1*<sup>+</sup>). Por el mismo procedimiento clonamos el gen *wsc1*<sup>+</sup> en el plásmido de sobreexpresión pREP81x obteniendo así el plásmido pRZ17 (pREP81x-*wsc1*<sup>+</sup>).

## 4.10 Deleción de *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>

### 4.10.1 Construcción del casete de deleción *mtl2*::*kanMX6*

Se realizó la sustitución de la ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> por el marcador *kan*, que codifica el gen de resistencia a kanamicina, clonado entre los sitios *BamHI-EcoRI* del sitio de clonación múltiple del plásmido KS (pKS-*kan*). Seguimos el mismo procedimiento que en la deleción con el gen de la histidina como marcador de selección (Apartado 2.1 de Resultados) y clonamos a ambos lados del marcador (*kan*) los fragmentos correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen *mtl2*<sup>+</sup>. El plásmido resultante se le denominó pSC13 y a partir de éste obtuvimos el fragmento de 4 kb que lleva el marcador *kanMX6* y las regiones 5' y 3' del gen *mtl2*<sup>+</sup>, que se empleó para transformar levaduras.

### 4.10.2 Construcción del casete de deleción *wsc1*::*kanMX6*

Para la obtención del casete de deleción utilizamos el marcador de selección *kan*, el gen que le confiere resistencia a kanamicina, clonado entre los sitios *BamHI-EcoRI* del sitio múltiple de clonación del plásmido KS (figura 26 de Resultados). A este plásmido que lleva los extremos 5' y 3' del gen *wsc1*<sup>+</sup> a ambos lados del marcador de

la kanamicina se le denominó pRZ3. Se digirió con las enzimas de restricción *XhoI*/*NotI* y el fragmento lineal de 3,5 kb se utilizó para transformar levaduras.

#### 4.11 Construcción del apagado *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ*

Primero se obtuvo la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup>* (SC58), mediante la técnica descrita por Bahler (Bähler et al., 1998). Se diseñaron parejas de oligonucleótidos (Mid2-FW y Mid2-RV) cuyos extremos presentan 20 nucleótidos que anillan en una reacción de PCR con los plásmidos usados como ADN molde y 80 nucleótidos homólogos a la región que se quiere intercambiar. Una vez obtenido por PCR el casete, se transformó la cepa silvestre YS64 y los transformantes se seleccionaron en medio rico suplementado con geneticina, ya que el casete además de la etiqueta molecular, presenta el gen bacteriano *kanMX6* que en levaduras confiere resistencia a la kanamicina. El casete lleva también el promotor *nmt1*, regulable por la presencia o ausencia de tiamina en el medio de cultivo (Forsburg, 1993).

Una vez construida la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup>* se cruzó con el mutante *wsc1::ura4<sup>+</sup>* (GRG18) y se seleccionaron los clones *kan<sup>+</sup>* y *ura<sup>+</sup>* en placas de MM y así obtuvimos la cepa *P81nmt1-mtl2 wsc1Δ* (SC82).

#### 4.12 Transformación de *E. coli*

La transformación de cepas de *E. coli* con plásmidos o mezclas de ligación se realizó de acuerdo con el procedimiento diseñado por Kushner en 1978 (Kushner,

1978), basado en el choque térmico.

En algunos casos, la transformación con plásmidos purificados se realizó por un método simplificado conocido como “transformación del minuto” descrito por Golub en 1988 (Golub, 1988). Para rescatar los plásmidos de levaduras se utilizó la técnica de electroporación según el protocolo descrito por (Sambrook et al., 1989).

#### 4.13 Transformación de *S. pombe*

La transformación de *S. pombe* se realizó por el método del LiSorb (acetato de litio-sorbitol). El cual se detalla a continuación:

- Se recogieron 50 ml de células en fase logarítmica (aproximadamente  $1 \times 10^7$  células/ml) por centrifugación durante 5 minutos a 3.000 rpm.

- Las células se lavaron con agua estéril y se centrifugaron de nuevo.

- A continuación se resuspendieron en 5ml de LiSorb (Acetato de Litio 100 mM, Tris 10 mM pH 8, EDTA 1mM, Sorbitol 1M) y se incubaron durante 20 minutos en agitación a 28°C.

- Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 63  $\mu$ l de LiSorb. A partir de este punto se mantuvieron siempre en hielo.

- Para cada reacción de transformación se mezclaron 15  $\mu$ l de células, 250-500 ng de ADN plasmídico y 15  $\mu$ l de ADN carrier en tampón LiSorb (una parte de ADN de



esperma de salmón 20 mg/ml hervido anteriormente por cuatro partes de LiSorb). La mezcla se incubó durante 10 minutos a 28°C sin agitación.

-A continuación se añadieron 450 µl de PEG al 40% en 100mM LiAc/TE a cada mezcla de transformación y se incubó 30 minutos a 28°C sin agitación.

-Seguidamente las células fueron sometidas a un choque térmico de 7 minutos a 42°C.

-Se centrifugaron 5 minutos a 2500 rpm y se resuspendieron en 1,5 ml de medio selectivo. Se dejaron recuperando de 1 a 3 horas a 28°C con agitación.

-Se repitió la centrifugación, resuspendiendo el precipitado en 400 µl de TE 1x pH 8 ó agua y finalmente se sembraron 100 µl de esta suspensión de células por placa de medio selectivo.

Las colonias fueron visibles después de 4-5 días de incubación a 28°C.

## 5. Métodos genéticos

### 5.1 Conjugación y obtención de diploides

Los experimentos de conjugación se realizaron utilizando estirpes heterotáticas de distinto sexo ( $h^+$  y  $h^-$ ). Para poner los cruces las cepas se sembraban en placas de YES hasta alcanzar la fase estacionaria (48 horas). Aproximadamente, se recogía el mismo número de células de la estirpe  $h^+$  y  $h^-$  y se mezclaba en un pequeño volumen de agua

estéril (20 µl). A continuación la mezcla se extendía en una placa de MEA. Los zigotos se forman al cabo de 12 a 20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas al cabo de 1-2 días de incubación a 28°C.

Aunque la fase diploide de *S. pombe* no es estable de forma natural, es posible conseguir cepas diploides de manera experimental. Para obtener células diploides, se realizaron cruces entre haploides  $h^+$  y  $h^-$  con requerimientos nutricionales complementarios. Por ejemplo, usando cepas con los marcadores *leu1-32*  $h^-$  y *ura4-D18*  $h^+$ , o bien cepas portadoras de los alelos *ade6-M210* o *ade6-M216*, que permiten la selección de diploides en medios carentes de adenina, por complementación intragénica.

A las 10-12 horas de haber puesto el correspondiente cruce (cuando la conjugación ya se había producido, pero aún no se detectaban esporas dentro de los zigotos), se extendió la mezcla de células del cruce en placas de MM con los suplementos adecuados, de forma que sólo las células diploides fueran capaces de seguir creciendo. Para evitar que los diploides esporulasen, tan pronto como aparecían las colonias (pequeños puntos), estas se trasladaban a placas de medio rico YES.

Los diploides así aislados se mantuvieron en YES con objeto de inhibir su esporulación, reestriéndolos cada día en medio fresco. Antes de realizar cualquier experimento con ellos, se comprobó su genotipo (mediante réplicas en placas de MM selectivo) así como su capacidad para esporular (en medio MEA) para evitar



seleccionar diploides estériles.

## 5.2 Aislamiento de ascosporas mediante micromanipulación

Se efectúa sobre cruces o diploides esporulados con el fin de analizar los productos de la segregación meiótica. El proceso se realiza con un micromanipulador automático (Singer Instruments MSM SYSTEM) de la forma siguiente:

-Se resuspende en 500 $\mu$ l de medio estéril una pequeña cantidad de cultivo esporulado y se extienden 10  $\mu$ l en un extremo de las placas de YES.

-Las ascas se trasladan a una zona de la placa libre de células y se dejan madurar de 4 a 6 horas a 28°C ó 37°C.

-Se separan las cuatro esporas de cada asca a posiciones libres de células en la misma placa.

-Las placas se incuban de 4 a 5 días a 28°C, o hasta que aparecen colonias.

-Posteriormente se hacen réplicas en placas de medio selectivo y se seleccionan los clones de interés.

## 5.3 Aislamiento de ascosporas al azar

Este tratamiento se empleó para obtener nuevas estirpes de *S. pombe* con determinados marcadores auxotróficos y también para realizar un análisis de la viabilidad de las esporas procedentes de ciertos cruces; en lo que se conoce como la

técnica de análisis de esporas al azar o “*random spores*”.

Al igual que la técnica anterior, se efectúa sobre cruces o diploides esporulados con el fin de analizar los productos de la segregación meiótica de una manera más rápida. La enzima  $\beta$ -glucuronidasa arilsulfatasa (EC 3.2.1.31; EC 3.1.6.1) destruye las células vegetativas de *S. pombe*, pero cuando se añade sobre cultivos esporulados, se consigue liberar al medio las esporas contenidas en las ascas, de forma que, al final del tratamiento, sólo las ascosporas resisten en el cultivo.

-Se recoge una parte del cultivo esporulado de las placas de MEA, unas 10.000 células o la punta de un palillo y se resuspenden en 1 ml de agua estéril.

-La suspensión se incuba en presencia de 2 $\mu$ l de  $\beta$ -glucuronidasa arilsulfatasa (*Roche*) en agitación y a temperatura ambiente durante 12 horas.

-Se recogen las esporas por centrifugación a 3.000 rpm durante 5 minutos.

-Se lavan y se cuenta el número de esporas con una cámara Thoma.

-Se extienden diluciones apropiadas de esporas (entre 500-1.500) en placas de medio YES o MM.

-Estas placas se incuban entre 4 y 5 días a 28°C.

-Se hacen réplicas en placas de medio selectivo y se seleccionan los clones de

interés.

### 5.4 Construcción de dobles mutantes y cepas marcadas con GFP

Para la construcción de dobles mutantes, o la introducción en determinadas cepas de proteínas integradas en el genoma y marcadas con algún epítipo o proteína fluorescente, se realizaron cruces genéticos entre las cepas parentales correspondientes. Finalmente se analizaron las colonias resultantes y se seleccionaron los clones que portaban las mutaciones de interés, los marcadores, epítipos, así como las auxotrofías y el tipo sexual adecuado.

## 6. Técnicas microscópicas

Para llevar a cabo estas técnicas se emplearon un microscopio *Leica DM RXA*, equipado con sistema de iluminación halógena y equipo de fotografía digital. Además se utilizó el equipo Personal Deltavision Microscope (*Applied Precision*), que consta de un microscopio invertido Plympus IX-70

### 6.1 Microscopía de contraste de fases y contraste interferencial (Nomarski)

Las muestras se tomaron directamente de los cultivos incubados en medio líquido o en placas para su observación. Las muestras se observaron en un microscopio *Leica DM RXA* con un sistema de filtros para microscopía de contraste interferencial.

### 6.2 Microscopía de fluorescencia

Para muestras fluorescentes se usaron los filtros adecuados que dejan pasar la luz UV de una determinada longitud de onda, según los espectros de excitación-emisión propios de los fluorocromos o proteínas fluorescentes utilizadas. Las imágenes obtenidas de esta manera se procesaron con el programa *Adobe Photoshop versión 7*, *Image J* y el programa de *Applied Byosystem* del microscopio *Deltavision*.

#### 6.2.1 Fluorescencia directa con GFP

La proteína verde fluorescente (GFP) es un polipéptido de 238 aminoácidos procedente de la medusa *Aequorea victoria* que posee la capacidad de emitir luz verde cuando se excita con luz ultravioleta de longitud de onda de 395 nm.

La GFP mantiene su capacidad para emitir luz verde cuando se expresa de forma heteróloga en células eucariotas o procariotas. Por ello suele usarse como sistema de detección de la expresión y localización subcelular de proteínas “in vivo”. Para ello, basta con fusionar la secuencia de ADN que codifica esta proteína con la del gen de la proteína objeto de estudio y observar la expresión de la proteína híbrida al microscopio de fluorescencia.

Existe además la proteína roja fluorescente (DsRFP) que emite luz de 586 nm de longitud de onda cuando es excitada con luz de 556 nm. Se han realizado modificaciones de la proteína RFP, como la *Cherry*, cuya luz de emisión es más brillante y estable, que emite luz de 610 nm de

longitud de onda cuando es excitada con luz de 587 nm. El marcaje de parejas de proteínas con diferentes combinaciones de proteínas fluorescentes permiten la realización de experimentos de co-localización (Shaner et al., 2005).

### 6.2.2. Tinción con calcoflúor

El Calcoflúor se une a los polímeros  $\beta$  (1,3) y  $\beta$ (1,4)-glucano de la pared celular de las levaduras y la desorganiza, por lo que se usa tanto para detectar anomalías en la pared como para determinar los lugares de crecimiento de la célula dependiendo de su concentración y tiempo de tratamiento (Nicholas et al., 1994; Streiblova, 1984). El Calcoflúor se excita al recibir luz de 372 nm de longitud de onda y emite fluorescencia azul.

El Calcoflúor (*Blancophor BBH*, Bayer Corporation), se preparó en agua a una concentración de 10 mg/ml. Para conseguir su total disolución se añadieron unas gotas de KOH 10N. Se esterilizó por filtración y se guardó a 4°C protegido de la luz.

La tinción con calcoflúor se realizó partiendo de cultivos líquidos creciendo en fase logarítmica. Las células se recogieron por centrifugación (5 minutos a 3.000rpm), se resuspendieron en una solución de agua con calcoflúor a una concentración final de 300  $\mu$ g/ml y se incubaron de 1 a 3 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavaron y concentraron para observar su fluorescencia.

## 7. Detección de *Mtl2pHA* y *Wsc1pHA*

Hace varios años se reportó un método rápido y confiable de extracción de proteínas en células de levadura panadera, basado en el tratamiento con bajas concentraciones de NaOH pero este método no es efectivo en la levadura de fisión, probablemente debido a la diferencia en la constitución de la pared celular (Kushnirov, 2000). Posteriormente Matsuo et. al (Matsuo et al., 2006) realizaron una modificación de este método combinando la extracción alcalina con la ebullición en SDS-sample buffer. Los extractos obtenidos por este método también son aplicables para “Western blot”.

Para poder visualizar *Wsc1p* fue necesario aplicar este método, que describimos a continuación:

-Partimos de un cultivo de células en medio rico (YES) a una  $DO_{600nm}$ .

-Se toman 10ml de cultivo y centrifugamos a 3000 rpm durante 5’.

-Se lava el pellet con 1ml de agua destilada.

-Se resuspende el pellet en 300 $\mu$ l de agua destilada.

-Se añade igual volumen (300 $\mu$ l) de NaOH 0.6M.

-Se incuba 10’ a temperatura ambiente.

-Se centrifuga nuevamente a 3.000 rpm durante 5’.

-Se añade al pellet 70 $\mu$ l de SDS-sample buffer (60mM Tris HCl ph 6.8, 4%  $\beta$ -mercaptoethanol, 4% SDS, 0.01% de BPB y

5% glicerol). Resuspender evitando hacer burbujas.

-Hervir durante 3’.

-Centrifugar brevemente.

-Cargar 15  $\mu$ l en un gel SDS-PAGE 8%.

Los extractos obtenidos pueden ser conservados a -20° hasta su uso.

Para comprobar el tamaño estimado de las proteínas Mtl2p y Wsc1p y realizar experimentos bioquímicos de interacción con otras proteínas, marcamos las proteínas con el epítipo inmunoreactivo de la hemaglutinina (HA) (Green et al., 1982).

### 7.1 Detección de Mtl2pHA

Para ello se introdujo el epítipo HA en fase con la secuencia codificante de *mtl2*<sup>+</sup>, obteniendo el plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC9). Este plásmido se introdujo en una cepa carente de *mtl2*<sup>+</sup> (YS1220) de tal manera que la única copia de *mtl2*<sup>+</sup> estaría marcada con el epítipo HA. La proteína marcada es completamente funcional puesto que las células que lleva el plásmido crecen como las de la estirpe silvestre en presencia de caspofungina.

Se obtuvieron extractos de proteínas según el método descrito en este apartado y se realizó inmunodetección mediante “Western blot”.

El anticuerpo monoclonal anti-HA reconoció un polipéptido con una masa molecular de aproximadamente 70 kDa,

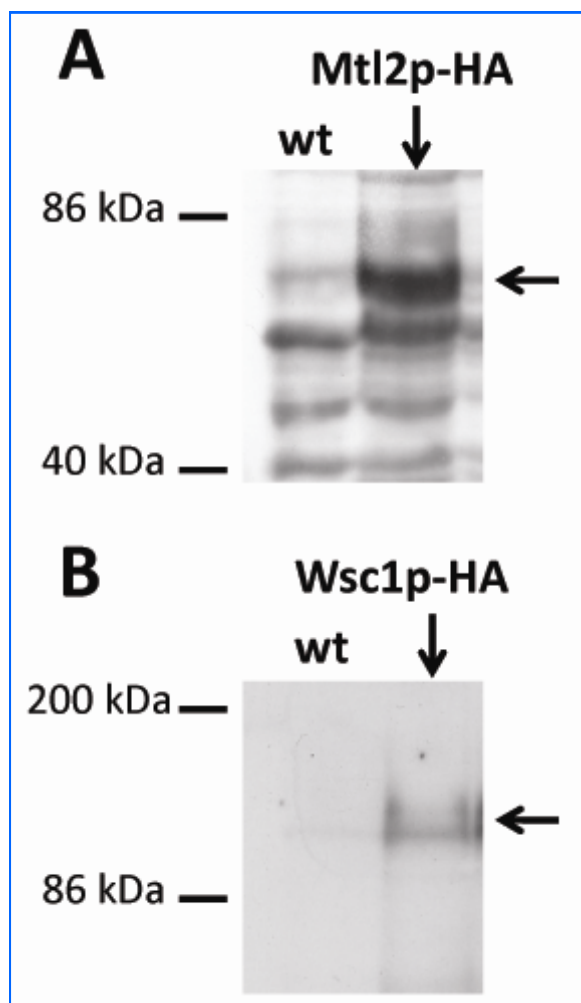
superior a los 52,9 kDa que debía tener según la base de datos (**figura 21-A**). Esta diferencia de tamaño puede ser atribuida a que el dominio rico en residuos de serinas y treoninas podría tener sitios de glicosilación.

### 7.2 Detección de Wsc1pHA

En el caso de Wsc1p fue necesario sobreexpresar la proteína para poder detectarla por “Western blot”. Partimos del plásmido pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (pRZ12) de donde obtuvimos la ORF del gen marcada con el epítipo HA que se insertó en el plásmido pJCR-L 3X, bajo el control de un promotor reprimible por tiamina (Forsburg, 1993) (pSC20). Se transformó una cepa carente de *wsc1*<sup>+</sup> (GRG15) y los transformantes fueron seleccionados en MM-leu+tiamina. Posteriormente se obtuvieron extractos celulares y se realizó inmunodetección mediante “Western blot”. El anticuerpo anti-HA detectó una proteína con una masa molecular de aproximadamente 120 kDa, muy superior a los 38,3 kDa que debía tener según la base de datos (**figura 21-B**).

Esta significativa diferencia de tamaño de la proteína también podría ser por la existencia de posibles sitios de glicosilación en el dominio rico en serinas y treoninas. Además pudiera ser que esta proteína sea modificada post-transduccionales por otros mecanismos y como está descrito en *S. cerevisiae*, el dominio C-terminal de las proteínas Wsc está altamente cargado (Verna et al., 1997), lo que puede explicar su movilidad aberrante en SDS-PAGE.

## 8. Ensayo de unión a rotequina



**Figura 21.** Peso molecular aparente de Mtl2p (A) y Wsc1p (B). Se obtuvieron extractos a partir de células de la cepa silvestre (izquierda) y del mutante *mtl2* $\Delta$  transformado con el plasmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup>-HA (pSC9) (panel A) y de la cepa silvestre y del mutante *wsc1* $\Delta$  transformado con el plasmado (pRE3X-*wsc1*<sup>+</sup>-HA, pSC20) (panel B). Las células se recogieron a una DO<sub>600nm</sub> de 0.5 y en el caso de la proteína *wsc1*<sup>+</sup>HA después de 24 horas en ausencia de tiamina. Las muestras obtenidas según el protocolo descrito anteriormente, se cargaron en un gel de SDS/poliacrilamida de 8% y fueron visualizados por inmunodetección con anticuerpo anti-HA a una dilución 1:5000.

## 8.1 Producción de Rotequina

Transformamos células DH5 $\alpha$  de *E. coli* con el plásmido pGEX-RBD (cedido por la Dra. Pilar Pérez) que lleva la secuencia codificante de GST-RBD (péptido C21 que

contiene el dominio de unión a RhoA (RBD, de Rho binding domain), de la proteína denominada rotequina, fusionada a la secuencia que codifica la GST (Reid et al., 1996). Las bacterias transformadas se incubaron a 28°C en 400 ml de medio LB con el antibiótico ampicilina (50  $\mu$ g/ml) hasta una DO<sub>600</sub> de 0,6-0,8. En ese momento se añadió IPTG a una concentración final de 0,5 mM, para inducir la expresión del gen que codifica la proteína de fusión, y se incubaron tres horas más a 28°C.

Las células se recogieron por centrifugación y se resuspendieron en 20 ml de PBS (tampón de fosfato salino: Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2mM, NaCl 137mM, KCl 2,7mM) frío al que se añadieron previamente diferentes inhibidores de proteasas (2  $\mu$ g/ml de leupeptina, 2  $\mu$ g/ml de pepstatina, 2  $\mu$ g/ml de aprotinina y 1 mM de PMSF) y lisozima a una concentración de 2 mg/ml. Tras 30 minutos de incubación en hielo las células se sonicaron cuatro veces a una potencia de 14  $\mu$ m de amplitud de onda durante 1 minuto. Se añadió Tritón X100 hasta alcanzar una concentración final del 1% y se centrifugaron a 7.800 x g durante 1 hora a baja temperatura.

Se recogió el sobrenadante y se incubó durante dos horas a 4°C con bolas de sefarosa que llevan unido glutation (*Pharmacia*) previamente equilibradas en PBS. Las bolas de glutation-sepharosa, con la proteína de fusión GST-RBD unida, se lavaron tres veces con 40 ml de PBS por centrifugación a baja velocidad. Por último, se resuspendieron en solución de lisis B: 0,5% NP-40, 20 mM NaCl, 10% glicerol, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM ditriotritol y 50 mM Tris-HCl pH 7,6, a la que se habían añadido

previamente diferentes inhibidores de proteasas. La cantidad de proteína se cuantificó en un gel de poliacrilamida al 12,5% comparándola con diferentes cantidades de seroalbúmina bovina.

## 8.2 Obtención de extractos celulares

$2,5 \times 10^8$  células se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 minutos y se lavaron una vez con EDTA 1mM. Las células se resuspendieron en 100  $\mu$ l de solución de lisis B con inhibidores de proteasas, se cubrieron con bolas de vidrio (*B. Braun Biotech Int.* de 0,45 nm de diámetro) y se rompieron en un agitador *Fast-Prep FP120 Bio 101 (Savant)* mediante dos pulsos de 20 segundos a una velocidad de 5,5. A continuación se añadieron otros 100  $\mu$ l de solución de lisis B con inhibidores de proteasas y el lisado se centrífugo a 8000 rpm durante 15 minutos para eliminar los restos de células, paredes celulares y bolas de vidrio. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas.

El sobrenadante se recogió y se cuantificó la concentración de proteína de los extractos usando el método colorimétrico de (Bradford, 1976). 20  $\mu$ g del extracto obtenido se llevaron al doble de volumen con tampón de carga 2X (Tris-HCl 0,1M pH 6,8, SDS 2%, glicerol 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,7 M y azul de bromofenol 0,08%) y se sometieron a SDS-PAGE e inmunodetección como se detalla a continuación.

## 8.3 Ensayo de unión

El ensayo se realizó según lo descrito

por (Ren et al., 1999). A partir de los extractos celulares obtenidos, tomamos 1,5 mg de proteína total, que llevamos hasta un volumen final de 300  $\mu$ l en la solución de lisis B y añadimos 40  $\mu$ l de la suspensión de bolas de glutation-sefarosa unidas a GST-RBD.

La mezcla se incubó a 4°C durante dos horas y se lavó tres veces con 1 ml de la solución B. Finalmente el precipitado se resuspendió en 20  $\mu$ l de tampón de carga 2X y se sometió a SDS-PAGE como se detalla a continuación.

## 8.4 Electroforesis y electrotransferencia de proteínas

Las muestras del extracto total y de los precipitados se hirvieron durante 5 minutos y se centrifugaron a 13.000 rpm durante otros 5 minutos.

Las proteínas se resolvieron por electroforesis en gels de poliacrilamida al 12% en condiciones desnaturizantes (1% SDS) a 100mV durante aproximadamente dos horas, según la técnica descrita por (Laemmli, 1970). El tampón de carrera 10X lleva: Tris base 30g/l, SDS 10g/l y Glicina 144g/l.

Las proteínas se transfirieron a membranas de PVDF, (*Immobilon<sup>TM</sup>-P, Millipore*), mediante el sistema *Mini-Trans-Blot (Bio-Rad)* durante 2 horas a 80mV, usando como tampón Tris-Glicina (Tris base 3 g/l y glicina 14,4 g/l).



## 8.5 Inmunodetección de proteínas

Las membranas se bloquearon en TBS (Tris base 2,5 g/l y NaCl 9 g/l) con seroalbúmina bovina al 3% durante 1 hora a temperatura ambiente. Después se incubaron durante 90 minutos a temperatura ambiente con el anticuerpo primario a la dilución apropiada en solución de bloqueo. Se lavaron tres veces durante 10 minutos con TBS-T (TBS con 0,3% de *Tween 20* de *Sigma*) y se incubaron después con un anticuerpo secundario anti-IgG unido a peroxidasa de rábano (HRP, horseradish peroxidase) durante 45 minutos. Las membranas se volvieron a lavar de nuevo tres veces en TBS-T y se añadió el sustrato para la detección de la actividad peroxidásica por quimioluminiscencia. Se empleó el “*kit*” *ECL* de *Amersham*. Las proteínas reconocidas por los anticuerpos se detectaron utilizando películas *X-Ray Film 100NIF* de *Fujifilm*.

Los anticuerpos utilizados fueron:

-anticuerpo monoclonal 12CA5 (*Boehringer*) contra el epítipo HA, a una dilución 1:5.000

-anticuerpo monoclonal anti-IgG de ratón unido a peroxidasa de rábano (*Amersham*) a una dilución 1:10.000.

## 9. Valoración de la actividad enzimática $\beta(1,3)$ -glucán sintasa

### 9.1 Obtención de extractos enzimáticos

Todas las manipulaciones se realizaron

de 0 a 4°C para no perder la actividad enzimática.

-100 ml de células creciendo en fase logarítmica ( $1 \times 10^7$  cel/ml) se recogieron por centrifugación a 3000 rpm durante 5 min.

-Se eliminaron restos de medio de cultivo con tampón de lavado (Tris HCl 50 mM pH 8, EDTA 1mM y  $\beta$ -mercaptoetanol 1 mM).

-Se resuspendieron en 100  $\mu$ l del tampón de lavado con inhibidores de proteasas.

-Se rompieron las células con bolas de vidrio (0,45 mm de diámetro, *B. Braun Biotech Int.*) en el sistema *Fast Prep FP120* (*Savant, Bio101*). Se emplearon tres pulsos de 15 segundos a una velocidad de 5,5 m/seg.

-Los extractos se diluyeron en 20 ml de tampón de lavado y los restos de paredes celulares y bolas de vidrio se eliminaron por centrifugación a 1.000 rpm durante 5 min.

-Se recogió el sobrenadante y se precipitaron las membranas celulares centrifugando 30 minutos a 18.000 rpm.

-El sedimento se resuspendió con ayuda de varillas de vidrio en 200  $\mu$ l del propio tampón de lavado con glicerol al 33%.

-Se realizó el ensayo  $\beta$ -GS tal y como se describe a continuación. Los extractos enzimáticos restantes se almacenaron a -70°C.



## 9.2 Ensayo enzimático

Se empleó como sustrato UDP-D-glucosa marcada radiactivamente con  $^{14}\text{C}$ . Se prepararon mezclas de reacción con y sin GTP. La mezcla de reacción con GTP contenía:

-Tris HCl 75 mM pH 8.

-UDP-D- $^{14}\text{C}$ -glucosa 5mM ( $2 \times 10^5$  cpm/ $\mu\text{mol}$ ).

-Seroalbúmina bovina 0,75 %.

-EDTA 2,125 mM.

-GTP 150  $\mu\text{M}$ .

Todo ello en un volumen final de 40  $\mu\text{l}$ , de los cuales 5  $\mu\text{l}$  correspondían al extracto de membranas. La reacción se llevó a cabo durante 30 minutos a 30°C. Al cabo de ese tiempo, se detuvo el proceso añadiendo 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10 %. El precipitado se filtró sobre un papel *Whatman GF/C*, se lavó 2 veces con TCA (ácido tricloroacético) al 10 % y otras 2 con etanol. Una vez secos, los filtros se pasaron a viales apropiados, añadiéndoles líquido de centelleo *OptiPhase "HiSafe"* (Wallace). La radiactividad incorporada en la reacción se midió en un contador de centelleo *Wallac 1409*.

Los resultados presentados en este trabajo resultan de calcular las medias de los valores obtenidos en 3 experimentos independientes, realizando cada uno de los experimentos con muestras duplicadas.

Se determinó la concentración de

proteína presente en el ensayo con el método de Bradford (Bradford, 1976).

Se define una unidad enzimática como la cantidad de enzima que cataliza la incorporación de 1  $\mu\text{mol}$  de sustrato (UDP-D-glucosa) por minuto a 30°C.

## 10. Fraccionamiento de los polímeros de la pared celular

Se utilizó una adaptación del método descrito por (Arellano et al., 1996). El protocolo consta de varias partes:

-Marcaje radiactivo de las células

-Extracción de las paredes

-Digestiones enzimáticas de las paredes

-Valoración

### 10.1 Marcaje radiactivo de las células

El marcaje radiactivo de las paredes de las células se realizó partiendo de cultivos de 10 ml a una  $\text{DO}_{600\text{nm}}$  de 0,8 incubados a 28°C. En el caso de la sobreexpresión de *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>* a las 28 horas en MM sin tiamina para inducir el promotor *nmt1*. Seis horas antes de recoger las células añadimos al cultivo D- $^{14}\text{C}$ -glucosa a una concentración de 3  $\mu\text{Ci/ml}$  en las cepas mutantes y 12 horas en las cepas que sobreexpresan *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>*.

## 10.2 Extracción de las paredes

Se realizó según el protocolo que se detalla a continuación. Además de la incorporación de glucosa en cada polímero valoramos la cantidad total de  $^{14}\text{C}$ -glucosa incorporada en las células y en las paredes.

-Las células se recogieron y se lavaron 2 veces con EDTA 1 mM y se resuspendieron en 1 ml de EDTA 1 mM.

-Se tomaron dos alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  para medir la incorporación total de glucosa radiactiva en las células.

-Las células se rompieron con bolas de vidrio (0,54 mm *B. Braun Biotech Int.*) en un sistema *Fast Prep FP120 (Savant, Bio101)*, se usaron tres pulsos de 20 segundos a velocidad 5,5 m/seg.

-La rotura se comprobó por observación al microscopio.

-Se eliminaron las bolitas y se centrífugo el extracto 5 min a 1000x g a 4°C para recoger las paredes.

-Lavamos el precipitado a 4°C tres veces con NaCl 5M para separar los restos de membranas de las paredes.

-Lavamos 3 veces con EDTA 1 mM a 4°C.

-Finalmente las paredes se resuspendieron en 500  $\mu\text{l}$  de EDTA 1 mM y se hirvieron 5 minutos para inactivar las posibles glucanasas de la pared.

-Se tomaron 2 alícuotas de 20  $\mu\text{l}$  para

determinar la incorporación total de glucosa radiactiva en las paredes.

-Los 460  $\mu\text{l}$  restantes se mantuvieron a 4°C. Posteriormente se hicieron alícuotas para fraccionar la pared celular en sus distintos componentes.

## 10.3 Digestiones enzimáticas de las paredes

Al final del protocolo de extracción de las paredes quedan 460  $\mu\text{l}$  que se dividieron en alícuotas para fraccionar la pared celular en sus distintos componentes, tal y como se expone a continuación (digestión con zimoliasa, etc.). Las reacciones se hicieron por duplicado y se incubaron 36 horas a 28°C.

Después de la incubación, las digestiones se centrifugaron 10 minutos a 13.000 rpm. Tomamos muestras de los sobrenadantes para valorar directamente (sobre papel *Whatman GF/C*) y el precipitado de las reacciones se lavó una vez con EDTA 1mM, se resuspendió y se almacenó en TCA al 10% para ser filtrado.

## 10.4 Filtrado de las muestras

Todas las alícuotas tomadas (excepto los sobrenadantes que se valoran directamente) se diluyeron con 1 ml de ácido tricloroacético (TCA) frío al 10%, manteniéndose a 4°C hasta ser filtradas sobre papel *Whatman GF/C*. Los filtros se lavaron 2 veces con 3 ml de TCA al 10% y dos veces con 1 ml de etanol 96%. Posteriormente se secaron y se determinó su radiactividad en un contador de centelleo *Wallac 1409*,

**DIGESTIÓN CON ZYMOLIASA**

100 µl Paredes celulares  
 50 µl Buffer Citrato-Fosfato pH 5,6 50mM  
 20 µl Zimoliasa 100T 10 mg/ml  
 30 µl H<sub>2</sub>O  
 El precipitado tras la reacción se consideró α(1,3)-glucano.

**DIGESTIÓN CON QUATAZIMA**

100 µl Paredes celulares  
 95 µl Buffer 2X fosfato potásico pH 7,5  
 5 µl Quantazima (20 U/µl)  
 El sobrenadante tras la reacción se consideró β(1,3)-glucano.

**CONTROL SIN ENZIMAS**

50 µl Paredes celulares  
 50 µl Buffer Citrato-Fosfato pH 5,6 50 mM

añadiendo líquido de centelleo *OptiPhase "Hi Safe"* (Wallace).

El precipitado correspondiente a la incubación con Zimoliasa 100T corresponde al α-D-glucano. El sobrenadante de la incubación con Quantazyme corresponde al β(1,3)-glucano. La diferencia entre los precipitados de Quantazyme y Zimoliasa 100T corresponde a galactomanano y β(1,6)-glucano.

## 11. Ensayo de determinación de la actividad de Pmk1p bajo condiciones de estrés

Se incubaron las células en medio rico YES o medio mínimo suplementado con los

correspondientes aminoácidos y en ausencia o presencia de tiamina según los casos a una temperatura de 28°C. Cuando las células alcanzaron una DO<sub>600</sub> de 0,5 se comenzó el tratamiento de estrés con NaCl 0,5M durante 30', KCl 0.6M durante 15', caspofungina 1µg/ml durante 1 hora y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6mM durante 15', respectivamente. También se determinó la actividad de Pmk1p a las 22 horas de sobreexpresión de los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> en la cepa silvestre.

En todos los casos se recogieron las células mediante filtración de 30 ml de cultivo, a continuación se extrajeron las células de los filtros en tubos de microcentrífuga fríos a los que previamente se le ha añadido 1ml de PBS 1X frío. Los precipitados resultantes se congelaron en hielo seco. A continuación, todas las muestras obtenidas se descongelaron y se resuspendieron en 200µl de buffer de lisis de Pmk1 (50mM TrisHCl pH=8, 150mM NaCl, 10% glicerol, NP-40 0.1%) con inhibidores de proteasas (2µg/ml aprotinina, 2µg/ml leupeptina y 1mM PMSF) incorporados. Las células se lisaron con bolitas de vidrio (G8772, Sigma) en una Fast-Prep FP120 (Bio 101 Savant) durante dos pulsos de 16 segundos a una velocidad de 6,0 m/seg. Se comprobó la rotura celular por observación al microscopio de contraste de fases. Las bolitas de vidrio, paredes y restos celulares se retiraron mediante centrifugación a 13.000 rpm durante 10'. Todo el proceso se realizó a 4°C para evitar la degradación de las proteínas. La concentración de proteína de los extractos obtenidos se cuantificó por el método colorimétrico descrito (Bradford, 1976). Pmk1-HA6H se purificó utilizando 60 µl de bolas de Níquel Ni<sup>2+</sup>-NTA Agarose (Qiagen) al 50% junto con 800µg de cada

extracto celular obtenido e incubando las distintas muestras durante dos horas en agitación a 4°C. Posteriormente, Pmk1p unida a las bolas de níquel se sedimentó por centrifugación y se lavó tres veces con 1ml de TrisHCL pH 8. Finalmente estos complejos proteicos se resuspendieron en 15 µl de tampón de carga 2X para proceder a la electroforesis en geles de 10% de poliacrilamida y posterior análisis por “Western blot”. Para detectar el estado activo de Pmk1p se utilizaron anticuerpos policlonales antifosfo-p44/42 (*Cell Signalling*) a una dilución de 1:2.500 y para detectar la cantidad total de Pmk1p purificada se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-HA, 12CA5 (*Boehringer*) a una dilución de 1:5.000.

Realizando igual procedimiento que para medir la actividad de Pmk1p, se determinó la actividad de Sty1p bajo condiciones de estrés con KCl 0.6M durante 15' y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.3mM, también por 15'. Se detectó su estado activo con la utilización del anticuerpo policlonal anti-fosfo-p38 (*Cell Signalling*) y para detectar la cantidad total de Sty1p purificada se utilizó el anticuerpo monoclonal anti-HA, 12CA5 (*Boehringer*) a una dilución de 1:5.000.

## 12. Análisis bioinformático de los datos

Para el análisis informático de las secuencias de ADN y de aminoácidos, alineamientos de secuencias y mapas de restricción, se utilizaron los programas DNASTARTM y DNASTRIDER.

Las secuencias génicas y proteicas se

obtuvieron de las bases de datos de *S. pombe*, The Wellcome Trust Sanger Institute *Schizosaccharomyces pombe* Gene DB (<http://www.genedb.org/genedb/pombe/>)

Para el análisis de los dominios proteicos se empleó la base de datos Pfam, SMART y PROSITE.

Las búsquedas bibliográficas se realizaron a través de las bases de datos centrales de la Universidad de Salamanca (MEDLINETM, Current ContentsTM, Life SciencesTM).

Para variaciones y dudas concretas sobre algunos protocolos se puede consultar *on line* el manual del laboratorio del Dr. Nurse en:

<http://www.hsph.harvard.edu/wolflab/Protocols/Protocols/Fission%20Lab%20Manual.htm>

# ***RESULTADOS***

## 1. Identificación de los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>

La habilidad para detectar cambios ambientales y ajustar la respuesta adecuada, es una propiedad esencial de todas las células vivas. Debido a su alto grado de compartimentación, las células eucariotas han desarrollado complejas cascadas de señalización, las cuales se inician con sensores localizados en la membrana plasmática y llevan a la regulación transcripcional dentro de los núcleos.

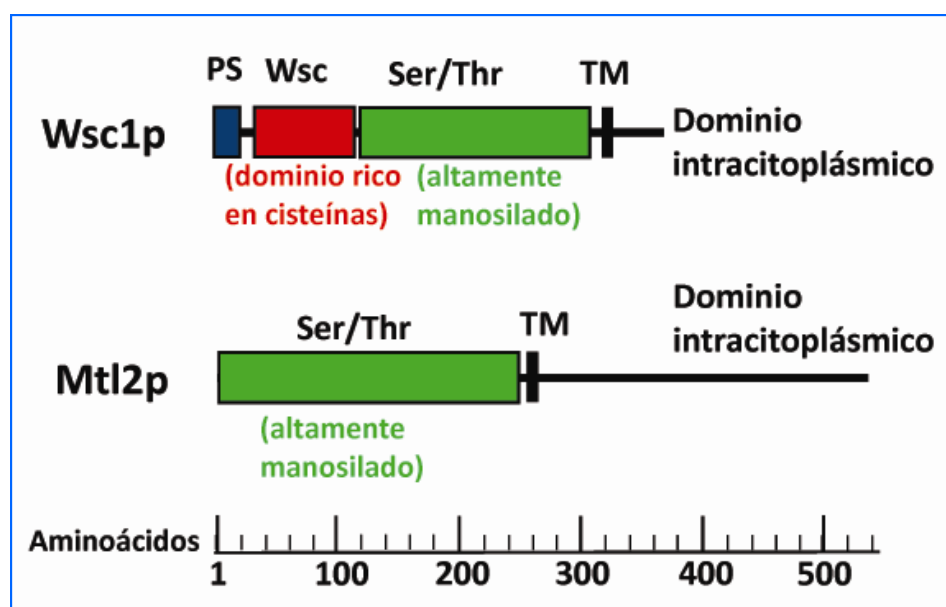
Para identificar componentes por encima de la ruta Rho1p/Pck1p/Pck2p que regula la integridad celular en *S. pombe* realizamos una búsqueda en la base de datos de *S. pombe* del Instituto Sanger, utilizando las proteínas ScWsc1p y ScMid2p, ambas consideradas como sensores en *Saccharomyces cerevisiae*. Probablemente debido al elevado número de serinas y treoninas que presentan tanto ScWsc1p como ScMid2p, (ver apartado 1.1), obtuvimos un

gran número de positivos. Sin embargo, sólo consideramos para nuestros estudios dos de ellas, (SPBC30B4.01c) y (SPAC11G7.01c) ya que ambas poseían una disposición de dominios similar a la de los sensores de *Saccharomyces cerevisiae*. A la ORF (SPBC30B4.01c) la denominamos SpWsc1p por ser la única proteína con un dominio Wsc (rico en cisteínas) en *S. pombe* y a la otra ORF, SPAC11G7.01c, la denominamos SpMtl2p (de Mid two like), porque presenta un mayor grado de identidad con ScMid2p y porque el nombre de Mid2p ya había sido asignado previamente a otra proteína en *S. pombe*.

### 1.1 Características de las proteínas Mtl2p y Wsc1p

**1.1.1 *mtl2*<sup>+</sup>:** es un gen cuya fase de lectura abierta (ORF) comprende 1.611 pb y se encuentra en el cromosoma I. La traducción de esta ORF da lugar a una proteína de 536 aminoácidos (aa') con un peso molecular estimado de 52.9 kDa

**Figura 22.** Esquema de la estructura de las proteínas Wsc1p y Mtl2p de *S. pombe*. Los dominios indicados son el extracitoplásmico (Ser/Thr), transmembrana (TM) y citoplásmico. Wsc1p posee además un péptido señal (PS) y un dominio rico en cisteínas (Wsc). La distribución de los distintos dominios en ambas proteínas es similar.



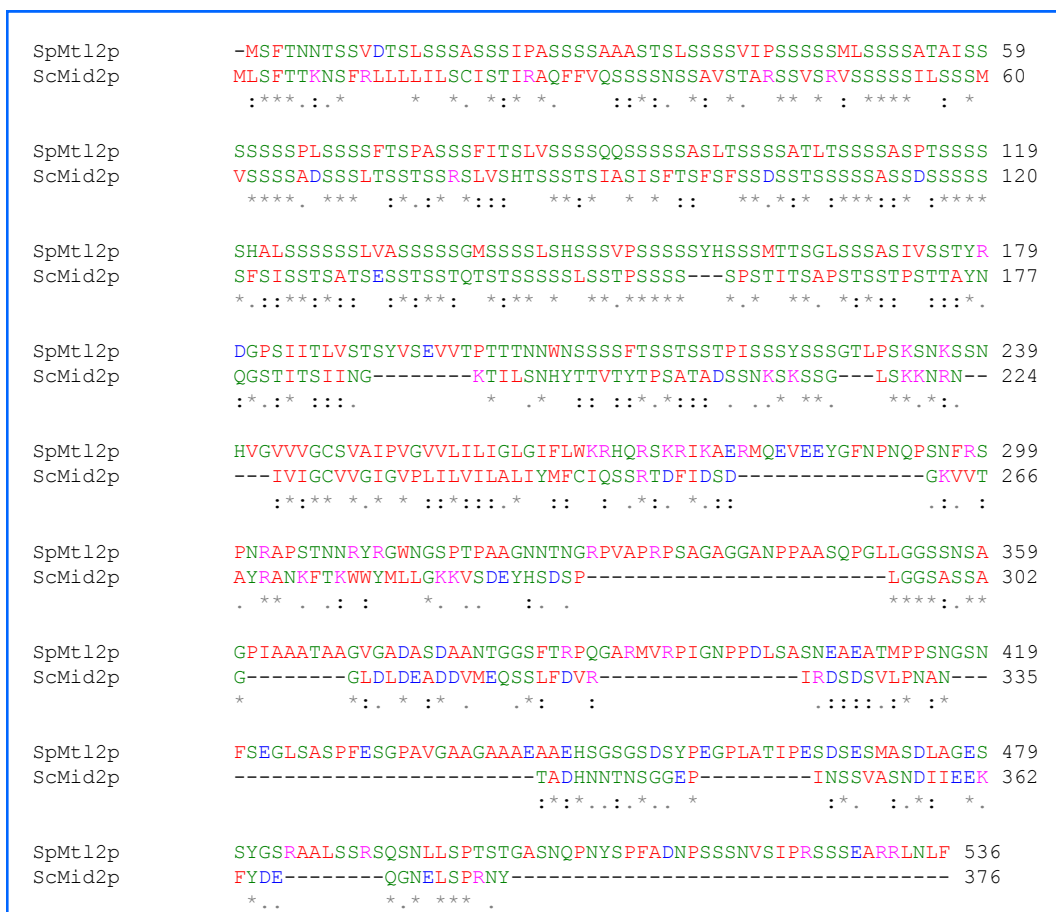
aproximadamente.

Un análisis detallado de la secuencia de Mtl2p revela la presencia de tres dominios tal y como se muestra en la **figura 22**. Hacia su extremo amino terminal se encuentra el dominio extracitoplásmico con una zona muy rica en residuos de serinas y treoninas (STR) (1-242 aa'). Esta zona tiene muchos sitios de glicosilación "potenciales" y podría tener un papel importante en el plegamiento y función de la proteína (Lodder et al., 1999). El siguiente es un pequeño dominio transmembrana (243-265 aa'), de características hidrofóbicas. Y por último un dominio intracitoplásmico largo (266-536 aa'), que posiblemente conecte el sensor con

la maquinaria de señalización interna. En *S. cerevisiae* se sabe que este dominio contribuye significativamente a la especificidad de la señal interna (Rodicio et al., 2008). Mtl2p carece de péptido señal.

El porcentaje de identidad entre la proteína Mtl2p de *S. pombe* y Mid2p de *S. cerevisiae* es del 33% y cuando se consideran los aminoácidos conservados o con funciones similares el porcentaje de similitud aumenta hasta el 55% (**figura 23**).

**1.1.2 wscI<sup>+</sup>**: la ORF correspondiente al gen *wscI<sup>+</sup>* consta de 1.125 pb, codifica una proteína de 374 aa' con un peso molecular aproximado de 38,3 kDa y se encuentra en el



**Figura 23.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Mtl2p de *S. pombe* con la secuencia de Mid2p de *S. cerevisiae*. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL. (\*) señala los aminoácidos idénticos, (:) indica los aminoácidos muy conservados y (.) aminoácidos que tienen función similar.

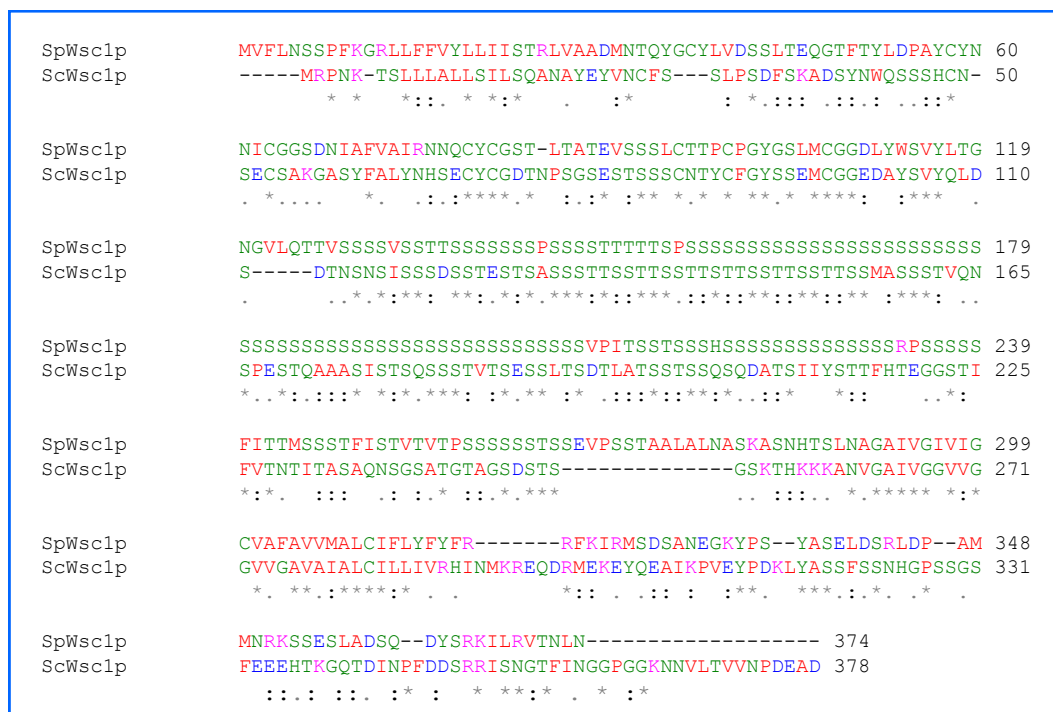


cromosoma II.

Esta proteína presenta los mismos dominios que la anterior (Mtl2p) aunque con ciertas diferencias (**figura 22**). En la región extracitoplásmica (1-292 aa'), Wsc1p posee una secuencia correspondiente a un péptido señal (1-20 aa'). Además presenta un motivo con 8 cisteínas, llamado también dominio Wsc o dominio rico en cisteínas (CRD) (34-109 aa'), que forma una estructura al final de la barra de serinas y treoninas y que podría "sentir" señales y/o modular la actividad de la proteína (Lodder et al., 1999). Es posible que este motivo sea el encargado de establecer el contacto con los glucanos de la pared celular. A continuación viene un dominio rico en residuos de serina y treonina (STR), que como hemos sugerido antes para SpMtl2p, podría estar fuertemente

glicosilado (Straede and Heinisch, 2007), y un dominio transmembrana (293-315 aa'). La cola citoplásmica (316-374 aa') es mucho menor que la de Mtl2p y se caracteriza por la presencia de aminoácidos cargados negativamente (5 de ácido aspártico). En *S. cerevisiae* se ha visto que tanto el dominio Wsc como la zona rica en residuos de serinas y treoninas son esenciales para la función de la proteína "in vivo" (Lodder et al., 1999).

Entre Wsc1p de *S. pombe* y Wsc1p de *S. cerevisiae* el porcentaje de aminoácidos idénticos es del 30% y al analizar los aminoácidos conservados o con funciones similares el porcentaje de similitud aumenta hasta un 48% (**figura 24**).



**Figura 24.** Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína Wsc1p de *S. pombe* con la secuencia de Wsc1p de *S. cerevisiae*. El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL. (\*) señala los aminoácidos idénticos, (:) indica los aminoácidos muy conservados y (.) indica los aminoácidos que tienen función similar.

## 2. Obtención y análisis de los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*

### 2.1 Obtención de los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*

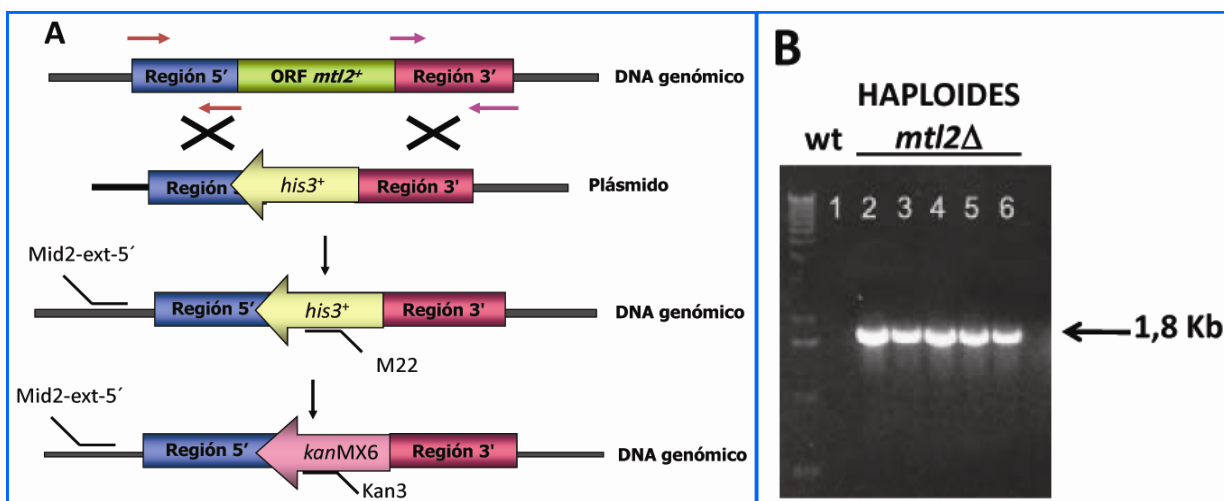
#### 2.1.1 Obtención del mutante nulo *mtl2Δ*

Para averiguar la posible función biológica de Mtl2p decidimos obtener cepas de *S. pombe* carentes del gen *mtl2*<sup>+</sup>. Para eliminar la ORF correspondiente a *mtl2*<sup>+</sup> se utilizó la técnica de reemplazamiento génico en un solo paso descrita por Rothstein (Rothstein, 1991; Rothstein, 1983). Esta técnica consiste en transformar la estirpe deseada con un fragmento lineal de ADN al que denominamos casete de delección, en el cual las regiones promotora y terminadora del gen *mtl2*<sup>+</sup> flanquean un marcador de selección del que carece la estirpe

transformada. Este fragmento se integra en el genoma por recombinación homóloga sustituyendo a la copia silvestre del gen.

Para la construcción del casete de delección de *mtl2*<sup>+</sup> utilizamos como marcador de selección el gen *his3*<sup>+</sup> clonado entre los sitios *PstI-EcoRV* del sitio múltiple de clonación del plásmido SK (pSK-*his3*). Un fragmento de 1,4 kb, correspondiente a la región promotora de *mtl2*<sup>+</sup>, se amplificó mediante PCR (Polymerase Chain Reaction) a partir de ADN genómico y se clonó entre los sitios *ApaI/SalI* del plásmido pSK-*his3*. El fragmento de 1,2 kb correspondiente a la región 3' se obtuvo por PCR y se clonó entre los sitios *PstI* y *NotI* del plásmido construido anteriormente (que lleva el extremo 5' de *mtl2*<sup>+</sup> y el gen *his3*<sup>+</sup>). El plásmido resultante se denominó pFM2.

El fragmento de 5,4 Kb obtenido a partir de pFM2 por digestión con *ApaI-NotI* que contiene el marcador *his3*<sup>+</sup> y las regiones



**Figura 25.** A-Estrategia empleada para deleccionar el gen *mtl2*<sup>+</sup>. Se representa la ORF del gen (1,4kb) en verde, las regiones flanqueantes del gen obtenidas por PCR (azul y rojo) así como el fragmento de 2.3k b procedente del plásmido pSK-*his3*, con el gen *his3*<sup>+</sup> (en amarillo) y el gen de resistencia a kanamicina, *kanMX6* (en rosa). También se muestran los oligonucleótidos utilizados para verificar por PCR de la interrupción del gen. B-La integración del casete de delección se comprobó mediante PCR en varios de los transformantes *mtl2Δ*. En la figura se muestra la banda de 1,8 kb obtenida utilizando los oligonucleótidos Mid 2-ext. y M22. No hay producto de PCR en la cepa silvestre.

3' y 5' de *mtl2*<sup>+</sup> se empleó para transformar la cepa de *S. pombe* YS64, haploide.

Se seleccionaron 20 transformantes *his3*<sup>+</sup> haploides y se sometieron a una prueba de estabilidad que en *S. pombe* es esencial porque la recombinación homóloga es mucho menos frecuente que en *S. cerevisiae*. Para ello, los estiramos cinco veces consecutivas en medio rico y posteriormente se replicaron en medio selectivo (MM sin Histidina).

19 de los 20 clones haploides analizados mantenían la prototrofia para histidina de forma estable. Para saber si el casete de delección se había integrado en el locus de *mtl2*<sup>+</sup>, amplificamos la región correspondiente con una pareja de oligonucleótidos en la que uno de ellos anilla con una secuencia externa al casete, en la región 5' de *mtl2*<sup>+</sup> (Mid 2-externo) y otro anilla con una secuencia dentro del gen *his3*<sup>+</sup> (M 22) tal y como se muestra en la **figura 25**. La presencia de cepas haploides en las que hemos eliminado la ORF de *mtl2*<sup>+</sup> nos indica que el gen *mtl2*<sup>+</sup> no es esencial para la viabilidad de la célula.

Por el mismo procedimiento construimos el casete de delección *mtl2::kanMX6* y obtuvimos las cepas correspondientes en las que la ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup> se sustituyó por el marcador de resistencia a kanamicina (ver Apartado 4.11.1 de Materiales y Métodos) (**figura 25**).

### 2.1.2 Obtención del mutante nulo *wsc1*Δ

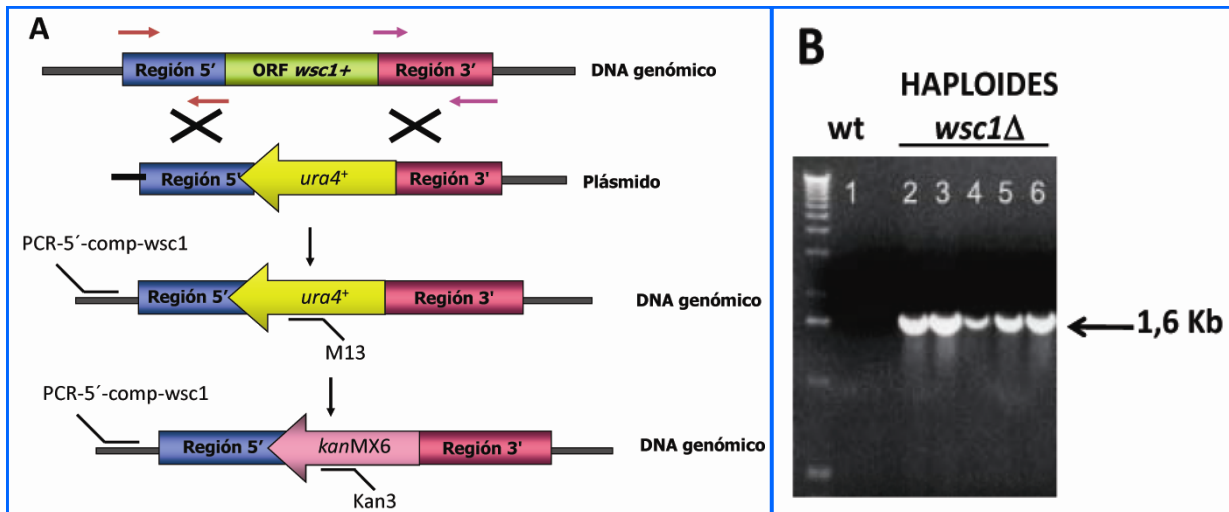
Para eliminar la ORF correspondiente al gen *wsc1*<sup>+</sup>, al igual que se hizo con el gen

*mtl2*<sup>+</sup>, se utilizó la técnica de remplazamiento génico en un solo paso descrita por Rothstein (Rothstein, 1991; Rothstein, 1983).

Para construir el casete de delección utilizamos el marcador de selección *ura4*<sup>+</sup> clonado entre los sitios *HindIII-PstI* del sitio múltiple de clonación del plásmido SK. Un fragmento de 1 kb de la región promotora del gen *wsc1*<sup>+</sup> fue amplificada mediante PCR a partir del ADN genómico y se clonó entre los sitios *XhoI/HindIII* del plásmido pSK-*ura4*<sup>+</sup>. De la misma manera se amplificó un fragmento de 1 kb correspondiente a la región 3' y se clonó entre los sitios *BamHI-NotI* del plásmido obtenido en el paso anterior. El plásmido resultante se denominó pCL5.

pCL5 se digirió con las enzimas de restricción *XhoI* y *NotI*, y el fragmento lineal que contenía el casete de delección completo (3,4kb) se utilizó para transformar la cepa haploide YS64 (**figura 26**). Los transformantes fueron seleccionados en MM sin uracilo y se realizó una prueba de estabilidad para eliminar los clones no estables. Algunos de los clones estables se analizaron mediante PCR, utilizando un oligonucleótido localizado dentro de la ORF del gen *ura4*<sup>+</sup> (M13) y otro localizado en el extremo 5', externo al casete de delección (PCR-5'-comprobación-wsc1) tal y como se muestra en la **figura 26**, panel de la derecha. Como en el caso anterior, la presencia de cepas haploides en la que hemos eliminado la ORF de *wsc1*<sup>+</sup> indica que el gen *wsc1*<sup>+</sup> no es esencial para la viabilidad de la célula.

Con el objetivo futuro de obtener mutantes dobles entre los genes *mtl2*<sup>+</sup> y



**Figura 26.** A-Estrategia seguida para eliminar el gen *wsc1*<sup>+</sup>. Se representa la ORF del gen (1kb) en verde, las regiones flanqueantes del gen obtenidas por PCR (azul y rojo) así como el fragmento de 1,4kb procedente del plásmido pSK-*ura*, con el gen *ura4*<sup>+</sup> (en amarillo) y el gen de resistencia a la kanamicina, *kanMX6* (en rosa). También se muestran los oligonucleótidos utilizados para la verificación por PCR de la delección del gen. B-La integración del casete de delección se comprobó mediante PCR en varios transformantes *wsc1Δ*. En la figura se muestra la banda de 1,6 Kb obtenida utilizando los oligonucleótidos PCR-5'-comp-wsc1 y M13 para el casete *ura4*. No hay producto de PCR en la cepa silvestre.

*wsc1*<sup>+</sup>, obtuvimos también cepas *wsc1::kanMX6*, en las que la ORF del gen *wsc1*<sup>+</sup> se ha sustituido por el gen que confiere resistencia a kanamicina (figura 26 y apartado 4.11.2 de Materiales y Métodos)

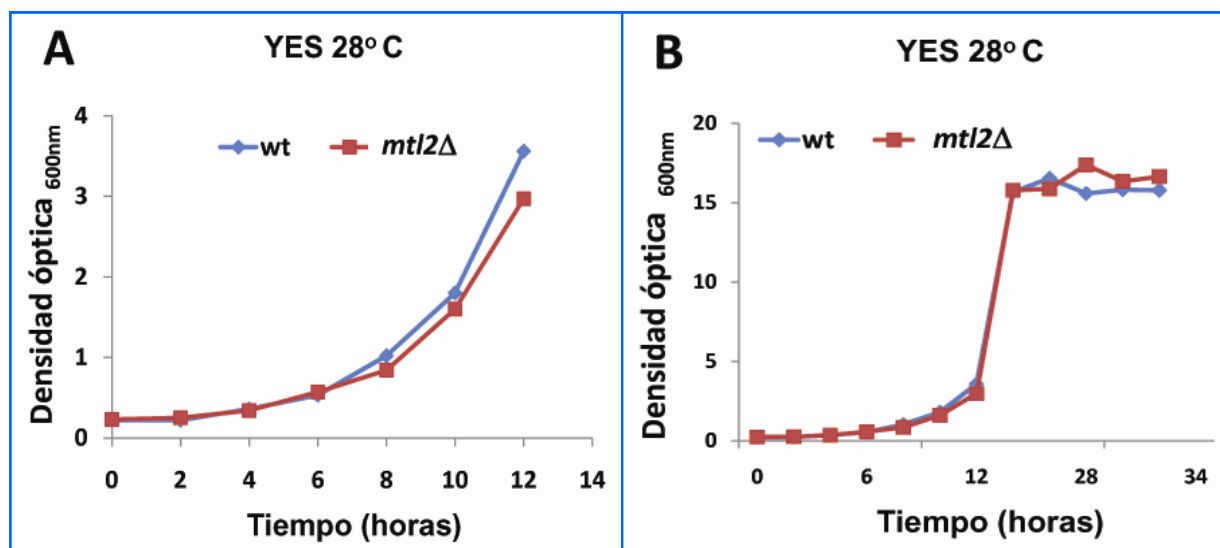
## 2.2 Análisis de los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*

Uno de los mecanismos empleados para conocer la función de un gen es analizar los fenotipos asociados a la carencia del mismo.

### 2.2.1 Crecimiento de las cepas *mtl2Δ* y *wsc1Δ* en distintas condiciones

Estudiamos en primer lugar la capacidad de los mutantes nulos *mtl2Δ* para crecer en distintos medios y a distintas temperaturas. Para ello se tomaron dos de los clones haploides *mtl2Δ*, denominados

YS1215 y YS1220 (Tabla I, Materiales y Métodos) y se realizaron ensayos de gota en placa. Partiendo de una suspensión de células de D.O<sub>600nm</sub> 2,7, se realizaron diluciones seriadas (8 x 10<sup>4</sup>, 4 x 10<sup>4</sup>, 2 x 10<sup>4</sup>, 2 x 10<sup>3</sup>, 2 x 10<sup>2</sup> y 2 x 10<sup>1</sup> cels/ml) y aproximadamente 3 μl de células de cada una de estas diluciones se sembraron con un dispositivo multidispensador en placas de medio rico (YES) a 25°C, 28°C, 32°C, y 37°C. Como estirpe silvestre se utilizó la cepa isogénica YS64. Tras 3 días de incubación observamos que tanto a 25°C como a 28°C, 32°C y 37°C no había diferencias de crecimiento entre las cepas mutantes y la cepa silvestre en medio rico. Sin embargo, al realizar el mismo experimento en medio mínimo (MM) observamos que la cepa *mtl2Δ* era incapaz de crecer a cualquier temperatura. Creemos que este defecto de crecimiento en MM se debe a un problema en el transporte de aminoácidos, específicamente leucina, ya que cuando transformamos las células del mutante nulo



**Figura 27** Curva de crecimiento del mutante nulo (YS1220) y de la cepa silvestre (YS64) a 28°C, en medio rico. Se tomaron muestras de los cultivos cada dos horas y se midió la D.O.<sub>600nm</sub>.

*mtl2Δ* con el plásmido pAL que lleva el gen *LEU2* de *S. cerevisiae*, que complementa la mutación *leu1-32* de *S. pombe*, las células crecen perfectamente en MM sin leucina. Este dato nos indica que probablemente la dificultad está en tomar la leucina a partir del medio de cultivo.

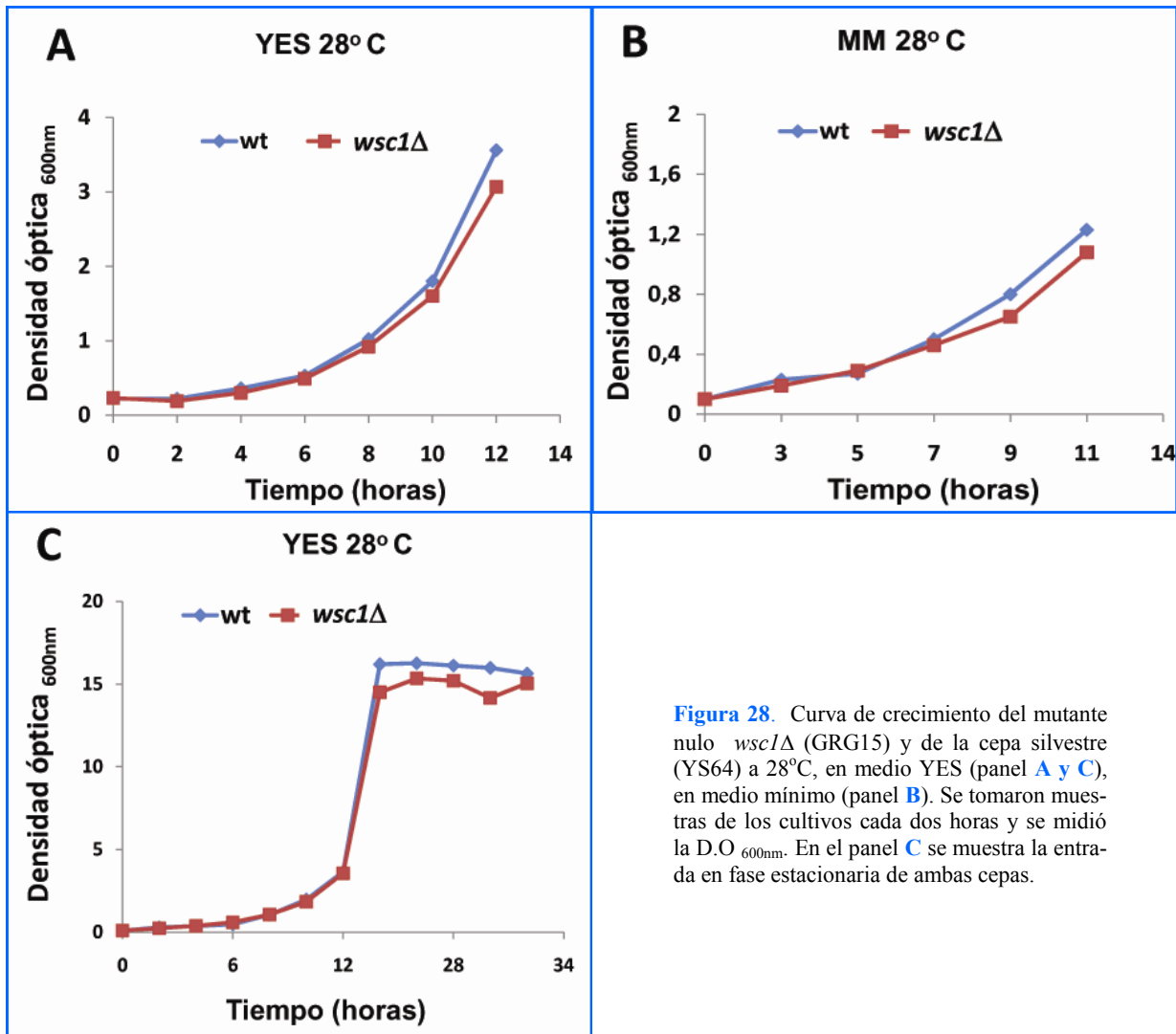
Se realizaron curvas de crecimiento en medio rico líquido (YES) a 28°C, tanto del mutante como de la estirpe silvestre. Para ello, cultivos de ambas cepas creciendo en fase logarítmica a 28°C fueron diluidos en medio fresco hasta una D.O.<sub>600nm</sub> inicial de 0,1 y se tomaron muestras cada dos horas durante un período de 12 horas.

Como se puede ver en la **figura 27** (panel de la izquierda), la velocidad de crecimiento de la cepa *mtl2Δ* es similar a la que presenta la estirpe silvestre (YS64). Tomando muestras a tiempos más largos, observamos que ambas cepas entran en fase estacionaria al mismo tiempo (**figura 27**, panel derecho).

Para caracterizar el fenotipo de la cepa *wsc1Δ*, también analizamos su capacidad de crecimiento a distintas temperaturas. Tomamos dos de los clones haploides *wsc1Δ* a los que denominamos GRG12 y GRG15 (**Tabla I**, Materiales y Métodos) y realizamos ensayos de crecimiento en placas de medio rico (YES) utilizando el procedimiento descrito anteriormente. Después de 3 días de incubación, no observamos diferencias de crecimiento entre la cepa silvestre y los mutantes a ninguna de las temperaturas analizadas (25°C, 28°C, 32°C y 37°C) (resultados no mostrados). Tampoco observamos diferencias en el crecimiento en placas de medio mínimo (MM) a distintas temperaturas, ni en el crecimiento en medio líquido, rico YES o MM a 28°C (**figura 28**).

### 2.2.2 Los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ* presentan defectos en la integridad celular

A continuación decidimos estudiar la



**Figura 28.** Curva de crecimiento del mutante nulo *wsc1Δ* (GRG15) y de la cepa silvestre (YS64) a 28°C, en medio YES (panel A y C), en medio mínimo (panel B). Se tomaron muestras de los cultivos cada dos horas y se midió la D.O<sub>600nm</sub>. En el panel C se muestra la entrada en fase estacionaria de ambas cepas.

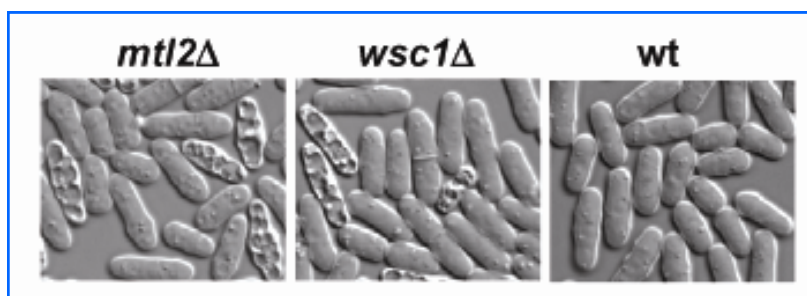
morfología de las células en fase logarítmica al microscopio de contraste interferencial (Nomarsky). En el mutante nulo *mtl2Δ* aunque la mayoría de las células son de tipo silvestre hay algunas células lisadas (células arrugadas con mayor refringencia) (figura 29). Realizamos varios recuentos en diferentes experimentos y observamos que aproximadamente el 15% de las células del cultivo se lisan y que el fenotipo de lisis se puede corregir añadiendo un estabilizador osmótico al medio (sorbitol 1,2M). También observamos algunas células con forma de cucharilla, es decir con uno de los extremos

redondeados. Este fenotipo representa aproximadamente el 23% de las células del cultivo (figura 30).

En el caso del mutante nulo *wsc1Δ*, la mayoría de las células son de tipo silvestre pero también hay algunas células lisadas (8%) (figura 29). En este caso las células lisadas también desaparecen en presencia de sorbitol.

Los daños en la pared celular provocan normalmente alteraciones morfológicas que van acompañadas de pérdida de la integridad





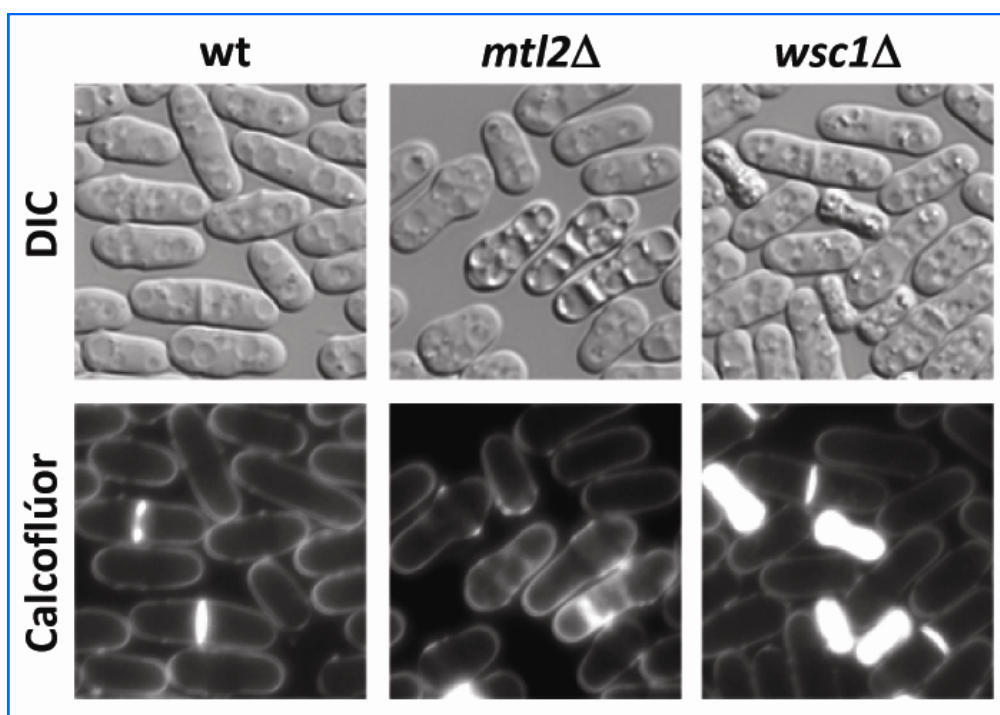
**Figura 29.** Fotografías de contraste interferencial (DIC) de la cepa silvestre YS64, del mutante *mtl2Δ* (YS1220) y el mutante *wsc1Δ* (GRG15). Las cepas se incubaron a 28°C en medio rico (YES líquido) hasta alcanzar la fase logarítmica temprana.

celular. El hecho de que un estabilizador osmótico como el sorbitol corrija el fenotipo de lisis de los mutantes podría indicar la existencia de dichas alteraciones. Por ello decidimos estudiar la morfología de las células en presencia del fluoróforo Calcoflúor White. El calcoflúor presenta afinidad por los polímeros de glucosa unidos mediante enlaces  $\beta(1,4)$ , como la quitina y la celulosa, y por los  $\beta(1,3)$  glucanos y en ambos casos forma complejos fluorescentes (Nicholas et al., 1994). En la **figura 30** se puede observar que la forma de algunas células es aberrante y la fluorescencia es

menos intensa en las células de los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ*.

### 2.2.3 Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* son sensibles a antifúngicos

Muchos mutantes de levaduras con defectos en la pared celular presentan mayor sensibilidad o resistencia que la estirpe silvestre a ciertos antifúngicos (Castro et al., 1995; Douglas et al., 1994; García et al., 2006; Qadota et al., 1996; Tajadura et al., 2004).



**Figura 30.** Fotografías de contraste interferencial y tinción con Calcoflúor de la cepa silvestre YS64 y los mutantes *mtl2Δ* (YS1220) y *wsc1Δ* (GRG15). Las cepas se incubaron a 28°C en medio rico (YES líquido) hasta alcanzar la fase logarítmica temprana.



Para comprobar si la eliminación de los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> podría afectar a la estructura de la pared celular, analizamos la sensibilidad y/o resistencia de los mutantes nulos, *mtl2*Δ y *wsc1*Δ, frente a dos tipos de antifúngicos: equinocandina y calcoflúor.

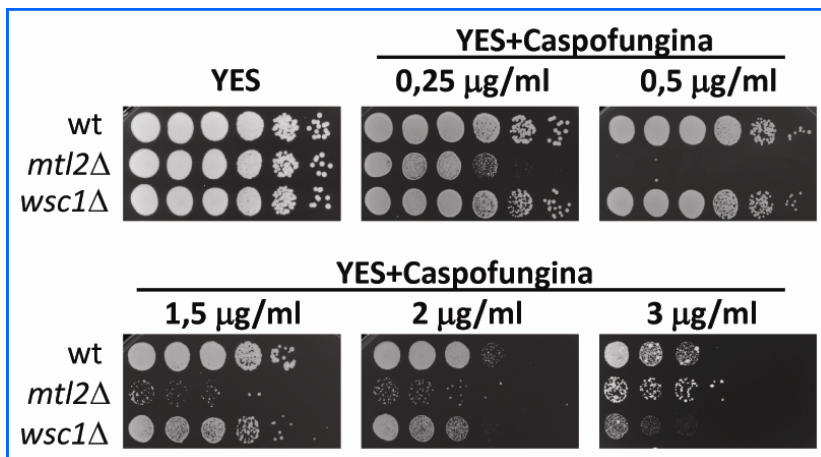
Las equinocandinas son hexapéptidos cíclicos que se describieron a finales de los años 70 y que actúan inhibiendo la biosíntesis de β(1,3)-glucano (Odds, 2003). El antifúngico CANCIDAS™ (acetato de caspofungina), pertenece a esta familia. La caspofungina es un derivado semisintético de un producto natural, la pneumocandina y ha sido aprobado en un gran número de países, incluido España, para el tratamiento de aspergilosis invasivas graves producidas por especies de *Aspergillus* y *Candida* (Deresinski and Stevens, 2003; Keating and Jarvis, 2001).

El calcoflúor se une a los polímeros de la pared celular y altera el ensamblaje de sus componentes desorganizándolos e impidiendo el crecimiento (Nicholas et al., 1994). Entre los polímeros de la pared celular de *S. pombe* parece que es el β(1,3)-glucano lineal, que se localiza en el septo, el

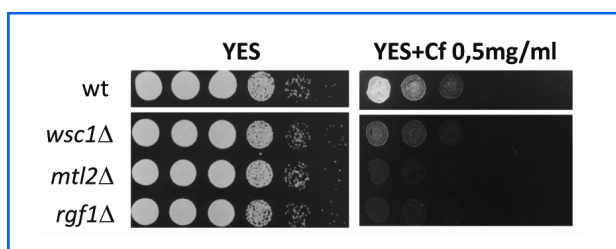
que presenta mayor afinidad por el calcoflúor debido a su estructura fibrilar (Cortés et al., 2007).

Para realizar este ensayo, se tomaron aproximadamente 2.7 x 10<sup>6</sup> células de cada cepa y se resuspendieron en 200μl de agua estéril. Se hicieron diluciones seriadas y mediante un dispositivo multidispensador se recogieron 3μl de cada pocillo y se depositaron en placas de medio rico (YES) suplementadas con diferentes concentraciones de caspofungina (de 0,25 a 3 μg/ml) (figura 31). La cepa *mtl2*Δ es muy sensible a este compuesto y es incapaz de crecer en placa a concentraciones superiores a 0.5 μg/ml, a diferencia de la estirpe silvestre que crece bien, incluso a concentraciones superiores a 4 μg/ml (datos no mostrados). La cepa *wsc1*Δ también es sensible a caspofungina pero a concentraciones más altas (2 μg/ml), tal y como se muestra en la figura 31.

También realizamos un experimento similar utilizando calcoflúor como antifúngico, es decir a una concentración mucho más alta que la que se utiliza para teñir las células. En la figura 32 se muestra



**Figura 31.** Ensayo de sensibilidad al antifúngico caspofungina de los mutantes *mtl2*Δ (YS1220), *wsc1*Δ (GRG15) y la cepa silvestre (YS64). Se hicieron diluciones seriadas de cada cepa (8x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>2</sup> y 2x10<sup>1</sup> cels/ml) y aproximadamente 3μl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de medio rico (YES) como control y YES suplementado con caspofungina (0,25μg/m, 0,5 μg/ml, 1,5μg/m, 2μ g/m y 3μg/m). Las placas se incubaron 3 días a 28°C.



**Figura 32.** Ensayo de sensibilidad al antifúngico calcoflúor de los mutantes *mtl2Δ* (YS1220), *wsc1Δ* (GRG15) y la cepa silvestre (YS64), utilizando *rgf1Δ* como control positivo. Se hicieron diluciones seriadas de cada cepa ( $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y aproximadamente  $3 \mu\text{l}$  de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES suplementado con calcoflúor 0,5 mg/ml.

que ambos mutantes (*mtl2Δ* y *wsc1Δ*) son incapaces de crecer en presencia de 0,5mg/ml del compuesto a diferencia de la estirpe silvestre. En el experimento utilizamos el mutante *rgf1Δ* como control por su sensibilidad al calcoflúor.

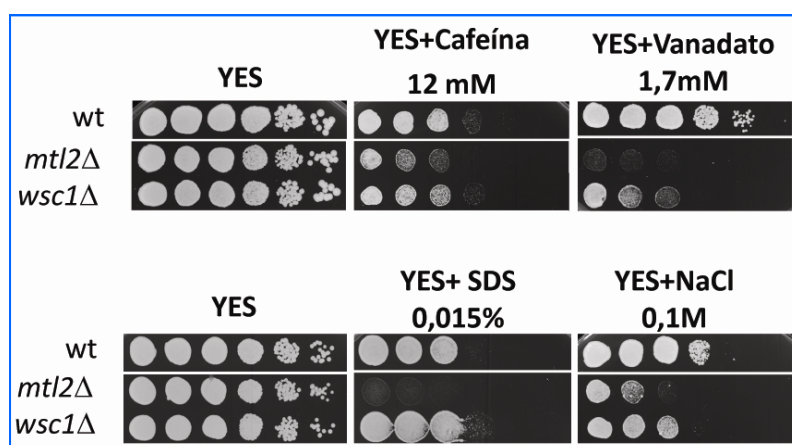
### 2.2.4 Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* son sensibles a distintos tipos de estrés

Realizamos ensayos de sensibilidad en placa frente a otros tipos de estrés (cafeína, SDS, cloruro sódico y vanadato sódico). Para analizar la sensibilidad frente a los distintos compuestos, en cada caso probamos una batería de concentraciones. En la **figura 33** se muestra la concentración en la cual observamos mayores diferencias entre la cepa silvestre y los mutantes. El mutante *mtl2Δ* es muy sensible a los diferentes tipos de estrés (cafeína 12mM, vanadato sódico 1.7mM, cloruro sódico 0.1M y SDS

0.015%), mientras que el mutante *wsc1Δ* es ligeramente sensible a vanadato sódico 1,7mM y NaCl 0,1M (**figura 33**).

### 2.2.5 El mutante *mtl2Δ* presenta defectos en la actividad $\beta(1,3)$ -glucán sintasa y en el contenido de $\beta$ -glucano de la pared celular

Los datos que hemos obtenido hasta ahora indican que los genes *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>* podrían tener la pared celular alterada. Para determinar si Mtl2p y/o Wsc1p participan en la regulación de la biosíntesis del  $\beta(1,3)$  glucano de la pared celular realizamos un ensayo para medir la actividad  $\beta$ -glucán sintasa “in vitro” en los mutantes nulos correspondientes. Recogimos las células en fase logarítmica, a partir de cultivos en medio rico y obtuvimos los extractos de membrana que empleamos como fuente de enzima en el experimento “in vitro”. Como



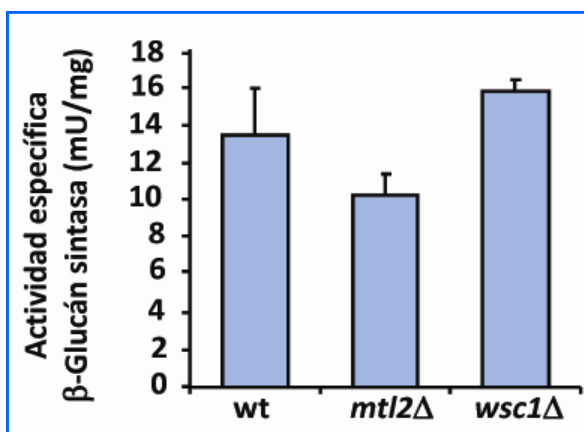
**Figura 33.** Crecimiento en placa de las cepas silvestre (YS64), *mtl2Δ* (YS1220) y *wsc1Δ* (GRG15). Partiendo de una suspensión de células se hicieron diluciones seriadas ( $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$ ) y aproximadamente  $3 \mu\text{l}$  de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y en YES suplementado con cafeína 12mM, vanadato sódico 1,7mM, SDS 0,015% y NaCl 0,1M. En todos los casos las placas se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 3 días.

sustrato para valorar la cantidad de glucano sintetizado empleamos  $^{14}\text{C}$ -UDP-glucosa marcada radiactivamente (ver Apartado 9 de Materiales Métodos).

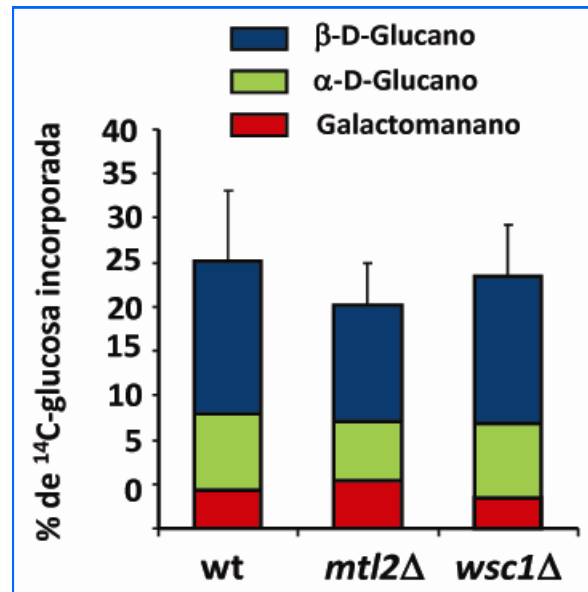
Como podemos apreciar en la **figura 34**, la actividad  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa en el mutante *mtl2* $\Delta$  se redujo un 25% comparada con la de la cepa silvestre. Aunque no es una diferencia muy grande, sí es repetitiva. El dato que aparece en la **figura 34** es la media de tres experimentos independientes.

En el mutante *wsc1* $\Delta$  los valores de la actividad  $\beta(1,3)$ -glucán sintasa son muy similares a los de la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que la pérdida de integridad en las células del mutante *mtl2* $\Delta$  podría ser debida a defectos en la biosíntesis de la pared celular.

También nos preguntamos si una disminución en la actividad  $\beta$ -glucán sintasa podría venir acompañada de una disminución de la síntesis de  $\beta$ -glucano “in vivo”.



**Figura 34.** Actividad de la enzima  $\beta(1,3)$  glucán sintasa en la cepa silvestre (YS64) y en los mutantes nulos *mtl2* $\Delta$  (YS1220), *wsc1* $\Delta$  (GRG15). Los valores representados son la media de la incorporación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar.



**Figura 35.** Composición de la pared celular en una cepa silvestre (YS64) y en los mutantes nulos *mtl2* $\Delta$  (YS1220) *wsc1* $\Delta$  (GRG15). En la gráfica se representan los niveles relativos de incorporación de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en cada uno de los polímeros que forman la pared celular. Incubamos las cepas en YES a 28°C y 6 horas antes de recoger las células añadimos  $^{14}\text{C}$ -D-glucosa radioactiva. Los valores representados son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la incorporación total de  $^{14}\text{C}$ -glucosa en la pared.

Realizamos una cuantificación de los polímeros mayoritarios de la pared celular en los mutantes nulos *mtl2* $\Delta$  y *wsc1* $\Delta$  (tal y como se describe en el Apartado 10 de Materiales y Métodos). Cultivos de 10ml de los dos mutantes y de la cepa silvestre, fueron incubados en medio rico añadiendo como sustrato D- $(^{14}\text{C})$ -glucosa durante las últimas 6 horas.

Como se puede apreciar en la **figura 35**, en el mutante *mtl2* $\Delta$  se produjo una disminución general de la síntesis de la pared celular (25% respecto al 30% de la cepa silvestre). Esta diferencia se debe principalmente a la disminución de la cantidad de  $\beta$ -glucano, 13% en el mutante *mtl2* $\Delta$  con respecto al 17% en la cepa

silvestre, y concuerda con la disminución de la actividad  $\beta$ -glucán sintasa medida “in vitro”.

No observamos diferencias en la composición de la pared celular entre el mutante *wsc1 $\Delta$*  y la cepa silvestre (figura 35).

### 3. El ciclo sexual se desarrolla normalmente en los mutantes nulos *mtl2 $\Delta$* y *wsc1 $\Delta$* .

En *S. cerevisiae* el mutante *mid2 $\Delta$*  pierde la integridad después del tratamiento con factor  $\alpha$ , que es la feromona sexual (Ono et al., 1994; Rajavel et al., 1999). Nos preguntamos si alguno de los mutantes *mtl2 $\Delta$*  o *wsc1 $\Delta$*  presentaba algún defecto en conjugación y/o esporulación.

Los experimentos de conjugación se realizaron utilizando estirpes heterotálicas de distinto sexo ( $h^+$  y  $h^-$ ) que procedían de cultivos en placa de medio YES inoculados 24 horas antes. Aproximadamente el mismo número de células de cada una de las cepas ( $h^+$  y  $h^-$ ), se mezclaron en un pequeño volumen de agua estéril (20 $\mu$ l), se depositaron en una placa de medio MEA y esta se incubó a 28°C. Los cigotos se forman al cabo de 12-20 horas e inmediatamente sufren meiosis y esporulación, formando ascas con 4 ascosporas que van apareciendo entre las 24-48 horas siguientes.

En *S. pombe* los cigotos se diferencian del resto de las células por su forma y mayor tamaño. Esto permite calcular la eficacia de

la conjugación dividiendo el número de cigotos formados (contados cada uno de ellos como dos células), entre el número total de células y expresando el total como porcentaje. El índice de conjugación se calculó por la siguiente fórmula:

$$\frac{\text{n}^\circ \text{ de cigotos} + \text{n}^\circ \text{ de ascas}}{\text{n}^\circ \text{ de cigotos} + \text{n}^\circ \text{ de ascas} + \text{n}^\circ \text{ de células}} = \%$$

Para determinar el efecto de la mutación *mtl2 $\Delta$*  y *wsc1 $\Delta$*  en el proceso de diferenciación sexual utilizamos las cepas isogénicas YS1215 (*mtl2 $\Delta$  h<sup>+</sup>*) y YS1220 (*mtl2 $\Delta$  h<sup>-</sup>*), GRG12 (*wsc1 $\Delta$  h<sup>+</sup>*) y GRG15 (*wsc1 $\Delta$  h<sup>-</sup>*). Cada cruce se repitió tres veces y se contaron al menos 300 células en cada muestra. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 1**.

En los cruces homocigóticos *mtl2 $\Delta$  h<sup>+</sup>* x *mtl2 $\Delta$  h<sup>-</sup>* y *wsc1 $\Delta$  h<sup>+</sup>* x *wsc1 $\Delta$  h<sup>-</sup>*, el número de cigotos y ascas formadas al cabo de 24 horas es similar al observado en los cruces isogénicos *mtl2<sup>+</sup> h<sup>+</sup>* x *mtl2<sup>+</sup> h<sup>-</sup>* y *wsc1<sup>+</sup> h<sup>+</sup>* x *wsc1<sup>+</sup> h<sup>-</sup>*. No encontramos diferencias significativas en la capacidad de conjugación de los mutantes con respecto a la estirpe silvestre.

Cuando analizamos la capacidad para formar ascas con cuatro ascosporas refringentes en estos mismos mutantes, tampoco observamos diferencias con respecto a los cruces silvestres. Finalmente, analizamos la viabilidad de las esporas obtenidas a partir de cruces homocigóticos mutantes o silvestres y el resultado fue muy parecido en ambos casos (resultados no mostrados).

	<i>mtl2Δ</i> (h <sup>+</sup> x h <sup>-</sup> )	<i>wsc1Δ</i> (h <sup>+</sup> x h <sup>-</sup> )	wt (h <sup>+</sup> x h <sup>-</sup> )
Ascas	18%	14,50%	6,2%
Zigotos	13%	15,20%	5,20%
Células	69%	70,20%	88,50%
% Conjugación	30,9%	29,7%	11,4%

**Tabla 1.** Porcentaje de ascas y zigotos en los cruces wt (h<sup>+</sup> x h<sup>-</sup>), *mtl2Δ* (h<sup>+</sup> x h<sup>-</sup>) y *wsc1Δ* (h<sup>+</sup> x h<sup>-</sup>) después de 24 horas en MEA. Se utilizaron las parejas de cepas YS64 (h<sup>-</sup>) y YS70 (h<sup>+</sup>), YS1215 (*mtl2Δ*h<sup>+</sup>) y YS1220 (*mtl2Δ*h<sup>-</sup>), GRG12 (*wsc1Δ*h<sup>+</sup>) y GRG15 (*wsc1Δ*h<sup>-</sup>). También se muestra el índice de conjugación (%) de las cepas mutantes *mtl2Δ*, *wsc1Δ* y la estirpe silvestre a las 24 horas.

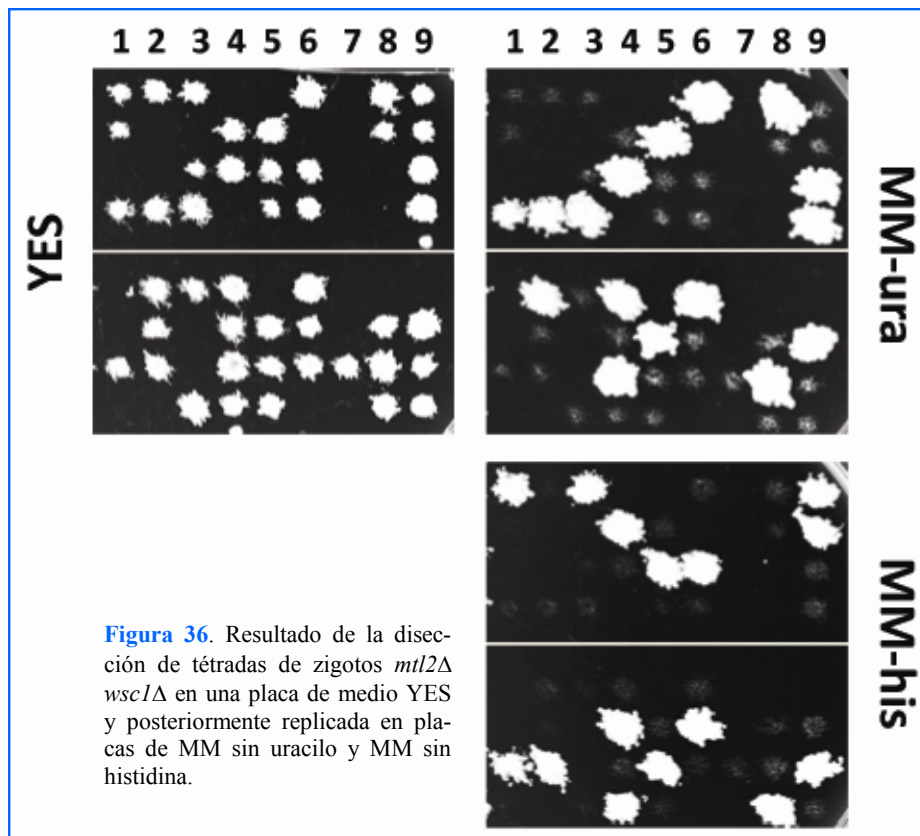
#### 4. La delección simultánea de *mtl2* y *wsc1* es letal

Para continuar estudiando la función de estos genes (*mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>) y después de haber comprobado que la delección individual

no afecta los procesos de conjugación y esporulación, nos propusimos estudiar el fenotipo de las cepas que carecen de *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> a la vez.

Al analizar tétradas del cruce *wsc1::ura4*<sup>+</sup> h<sup>-</sup> x *mtl2::his3*<sup>+</sup> h<sup>+</sup>, no encontramos ninguna espora de fenotipo *his*<sup>+</sup> *ura*<sup>+</sup>. De 18 ascas analizadas: 9 tenían tres esporas (una espora *his*<sup>-</sup> *ura*<sup>-</sup>, una *his*<sup>+</sup> *ura*<sup>-</sup>, una *his*<sup>-</sup> *ura*<sup>+</sup> y una inviable que debería ser *his*<sup>+</sup> *ura*<sup>+</sup>), dos ascas produjeron 4 esporas de tipo parental viables, un asca, 3 esporas de tipo parental y 6 ascas tenían sólo dos esporas viables *his*<sup>-</sup> *ura*<sup>-</sup> (figura 36). Nuestros datos indican que la delección simultánea de *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> es letal.

#### 4.1 Niveles muy bajos de Mtl2p y Wsc1p provocan la lisis de las



**Figura 36.** Resultado de la disección de tétradas de zigotos *mtl2Δ wsc1Δ* en una placa de medio YES y posteriormente replicada en placas de MM sin uracilo y MM sin histidina.

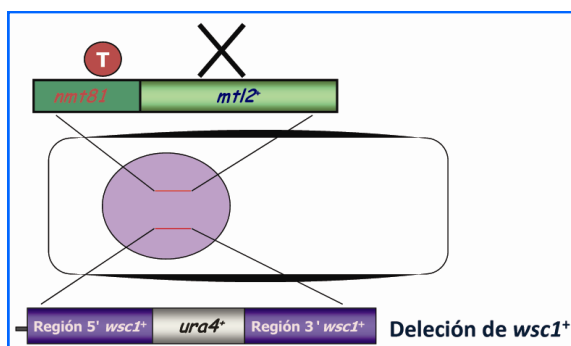


## células

El efecto de letalidad sintética observado anteriormente podría ser consecuencia de un problema en la germinación de las esporas, donde ambas proteínas fueran necesarias.

Para investigar la pérdida de función de Mtl2p y Wsc1p a la vez durante el crecimiento vegetativo, construimos la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC82) según el esquema que se muestra en la (figura 37). Primero obtuvimos el mutante *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup>* (SC58), intercambiando el promotor endógeno del gen *mtl2<sup>+</sup>* por un casete que lleva el promotor de baja expresión *81nmt1* y el marcador de resistencia a kanamicina (Bähler et al., 1998) (Apartado 4.11 de Materiales y Métodos), después cruzamos la cepa SC58 con el mutante *wsc1::ura4<sup>+</sup>* (GRG18) y seleccionamos aquellos clones *ura<sup>+</sup>* que crecían en placas de MM (sin tiamina) y no lo hacían en placas de YES (con tiamina) (figura 37).

En esta cepa, SC82, el promotor endógeno del gen *mtl2<sup>+</sup>* se ha sustituido por el promotor *81nmt1* regulado por tiamina, de

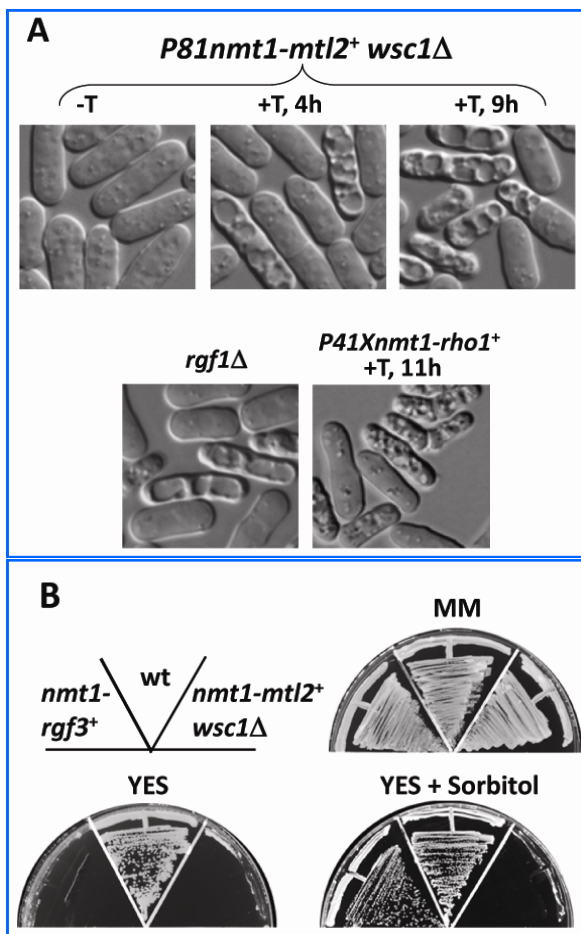


**Figura 37.** Representación esquemática de la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC82). La cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup>* (SC58) (verde), se cruzó por el mutante *wsc1Δ* (GRG18) (morado) y se seleccionaron los clones *kan<sup>+</sup>* y *ura<sup>+</sup>*.

manera que la cantidad de Mtl2p se puede manipular añadiendo o quitando tiamina del medio de cultivo (Forsburg, 1993).

En la figura 38-A se muestra que en ausencia de tiamina, cuando el gen *mtl2<sup>+</sup>* se está expresando, las células crecen perfectamente y presentan una morfología normal (promotor desreprimido). Cuatro horas después de la adición de tiamina al medio, aparece un gran número de células arrugadas y a las 9 horas prácticamente todo el cultivo se ha lisado. El fenotipo de lisis visto en el doble mutante *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* es similar al observado en el mutante *rgf1Δ* y en células con niveles muy bajos de Rho1p (*p41Xnmt1-rho1<sup>+</sup>*). Sin embargo mientras que en la disminución de los niveles de Rho1p la causa de la muerte celular es principalmente por la lisis de las células que se están dividiendo en ese momento (Arellano et al., 1997), en este caso la mayoría de las células lisadas tienen forma alargada, un fenotipo característico de mutantes nulos de *rgf1<sup>+</sup>* y probablemente relacionado con su defecto en NETO (García et al., 2006).

La muerte celular debido a la disminución de Rho1p no puede ser prevenida por un estabilizador osmótico (Arellano et al., 1997). Por lo tanto nos preguntamos si el fenotipo de lisis de la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (en presencia de tiamina), podría ser suprimido en presencia de un estabilizador osmótico. Como control del experimento utilizamos la cepa *P81nmt1-rgf3<sup>+</sup>* en la que silenciamos la expresión del gen *rgf3<sup>+</sup>*. Esta cepa es inviable en presencia de tiamina (puesto que *rgf3<sup>+</sup>* es un gen esencial), sin embargo las células crecen si se añade sorbitol al medio de cultivo (Tajadura



**Figura 38.** A- Fotografías de contraste interferencial de las células *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC82) tomadas en ausencia de tiamina y después de 4 y 9 horas en presencia de 15  $\mu$ g/ml de tiamina. En el panel inferior se muestran las células del mutante *rgf1Δ* (PG327) y de la cepa *rho1Δ* + pREP41X *nmt1-rho1<sup>+</sup>* (PPG217) después de 11 horas en presencia de tiamina. T: tiamina. B- Las cepas: wt (972 h<sup>-1</sup>) *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC82) y *nmt1-rgf3<sup>+</sup>* (VT88) se estiraron en placas de MM (no lleva tiamina), YES (contiene tiamina) y YES con sorbitol 1,2 M y se incubaron a 28°C durante 3 días.

et al., 2004).

En nuestro caso, tal y como se muestra en la **figura 38-B**, las células de *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* fueron incapaces de crecer en medio rico YES (promotor apagado) tanto en presencia como en ausencia de 1,2M de sorbitol. El fenotipo de estas células es muy parecido al de las células del mutante *rgf1Δ* o

al de células con niveles muy bajos de Rho1p, lo que sugiere que células con niveles muy bajos de Mtl2p y Wsc1p podrían tener defectos en la activación de Rho1p o de alguno de sus efectores.

## 5. Clonación de *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>*

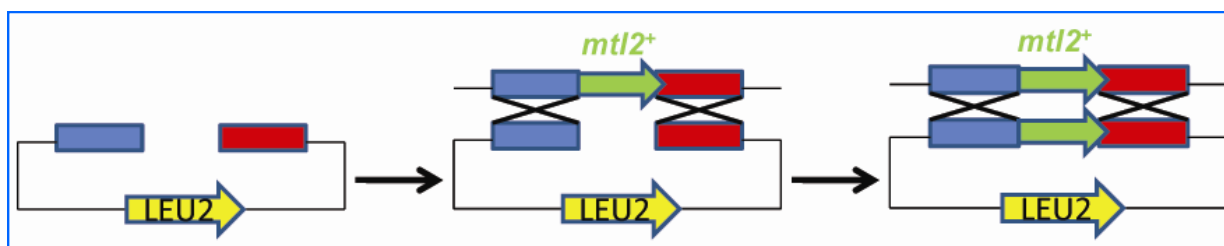
Decidimos abordar la clonación de los genes *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>* para comprobar si cada uno de ellos era capaz de revertir el fenotipo del mutante que habíamos creado mediante delección y también para poder estudiar su localización, etc.

### 5.1 Clonación de *mtl2<sup>+</sup>*

El gen *mtl2<sup>+</sup>* se clonó por la técnica de “gap repair” o reparación del hueco, descrita por Orr-Weaver (Orr-Weaver et al., 1991) (ver Materiales y Métodos Apartado 4.7).

Para obtener la copia cromosómica del gen *mtl2<sup>+</sup>*, partimos del plásmido pAL-KS que contiene el marcador de selección *LEU2* de *S. cerevisiae*. En este plásmido primero se clonó un fragmento *ApaI/SalI* de aproximadamente 1,4 kb, correspondiente a la región promotora de *mtl2<sup>+</sup>*, entre los sitios *ApaI/SalI* de la secuencia de clonación múltiple. En segundo lugar se clonó un fragmento *PstI/NotI* de 1,2 kb que incluye la región terminadora de dicho gen en los mismos sitios de la secuencia de clonación múltiple del plásmido obtenido anteriormente (que lleva la región 5’). Posteriormente se linealizó el plásmido así obtenido digiriendo con la enzima de restricción *SalI*, de forma que las regiones flanqueantes del gen queden en los extremos,





**Figura 39.** Representación esquemática de la técnica de *GAP REPAIR* empleada para obtener el gen *mtl2*<sup>+</sup>. Los recuadros azules representan la región promotora de *mtl2*<sup>+</sup>. Los recuadros rojos representan la región terminadora del gen *mtl2*<sup>-</sup> y en verde la ORF del gen *mtl2*<sup>+</sup>.

y se transformó la cepa silvestre haploide de *S. pombe* (YS64).

Mediante recombinación de los extremos del plásmido con las regiones homólogas presentes en el genoma, la copia cromosomal se introduce en el plásmido (ver esquema en la **figura 39**). Los transformantes capaces de crecer en MM sin leucina, se replicaron 5 veces en placas de YES y se eligieron aquellos que eran inestables, es decir capaces de perder el plásmido que les permite crecer en MM sin leucina. Posteriormente se extrajo el ADN de varios de estos transformantes, se recuperó el plásmido en *E. coli* y se sometió a análisis de restricción. Analizamos 8 clones y todos tenían el gen *mtl2*<sup>+</sup>. Al plásmido obtenido de esta forma se le denominó pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC2) (**figura 41-A**).

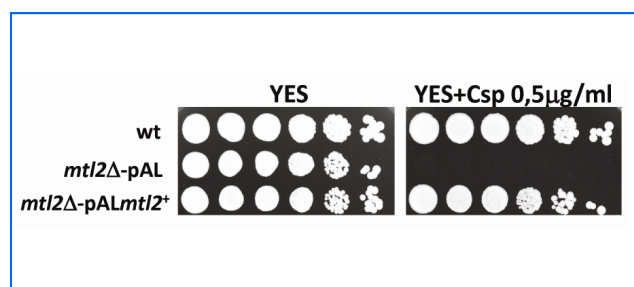
El plásmido pAL- *mtl2*<sup>+</sup> complementa el fenotipo de lisis (datos no mostrados) y de hipersensibilidad a caspofungina del mutante

*mtl2Δ*, mientras que el vector vacío pAL no logra rescatar este fenotipo (**figura40**).

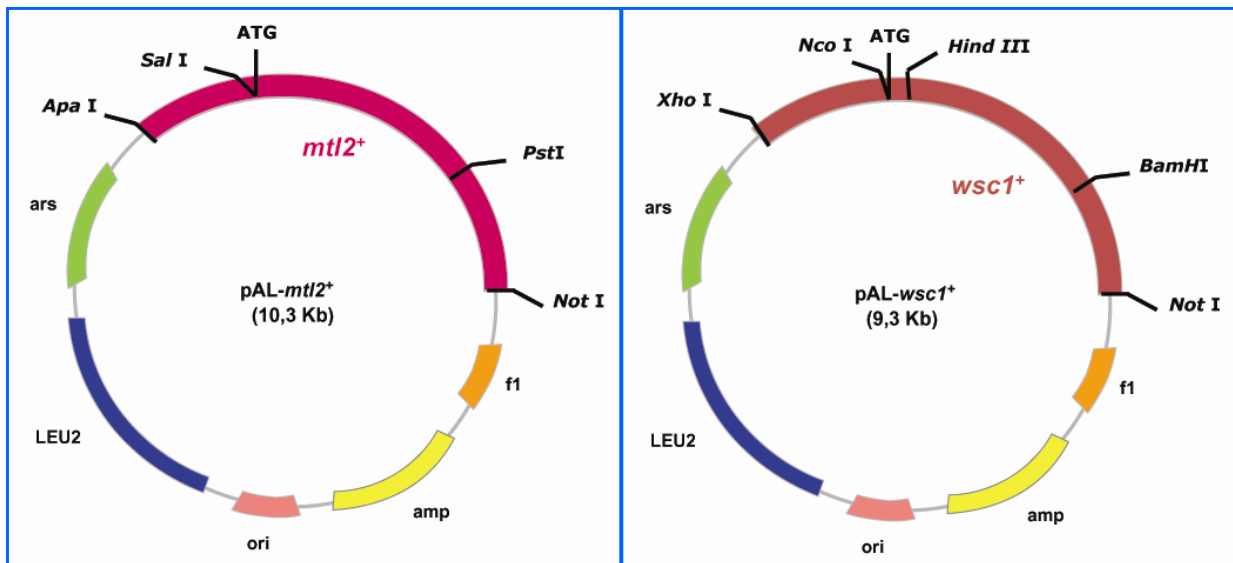
## 5.2 Clonación de *wscI*<sup>+</sup>

Se partió del plásmido pCL5, que contiene el caste de delección de *wscI*<sup>+</sup>, con las regiones 5' y 3' (descrito en el apartado 2.1.2). pCL5 fue digerido con las enzimas de restricción *NcoI/BamHI* para eliminar el gen *ura4*<sup>+</sup> y sustituirlo por la ORF del gen *wscI*<sup>+</sup> (previamente amplificada por PCR con los mismos extremos *NcoI/BamHI*).

El plásmido obtenido se denominó pCL9 y contiene la ORF del gen *wscI*<sup>+</sup> con sus regiones flanqueantes en un vector SK. Antes de proseguir con las manipulaciones, diseñamos oligonucleótidos cada 400 pares de bases (*WscSEC1*, *WscSEC2* y *WscSEC3*) y secuenciamos la ORF de 4 clones diferentes de pCL9. Comprobamos que no había ninguna mutación con respecto a la



**Figura 40.** *mtl2*<sup>+</sup> complementa el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante nulo *mtl2Δ*. La cepa *mtl2Δ* (YS1220) fue transformada con los plásmidos pAL y pAL-*mtl2*<sup>+</sup>. Se realizaron diluciones seriadas ( $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y aproximadamente 3µl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES suplementado con caspofungina (0,5 µg/ml) y se incubaron a 28°C durante tres días. (Csp: caspofungina)



**Figura 41.** Clonación de los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> en el plásmido pAL. **A** pAL-*mtl2*<sup>+</sup>. La zona sombreada en rojo se corresponde con la región codificante del gen *mtl2*<sup>+</sup> más 1,4 kb de la región promotora (*ApaI/SalI*) y 1,2 kb de la región terminadora (*PstI/NotI*). **B** pAL-*wsc1*<sup>+</sup>. La zona sombreada en marrón se corresponde con la región codificante del gen *wsc1*<sup>+</sup> más 1 kb de la región promotora (*XhoI/HindIII*) y 1 kb de la región terminadora. Se indican las posiciones de los sitios de corte para algunas endonucleasas de restricción.

secuencia obtenida a partir de la base de datos.

Finalmente digerimos pCL9 con las enzimas *XhoI/NotI* y el fragmento de aproximadamente 3 kb que lleva la ORF del gen con su región promotora y terminadora se insertó en un plásmido pAL, obteniendo de esta forma el plásmido pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (pCL10) (figura 41-B).

## 6. *Mtl2p* y *Wsc1p* se localizan en la superficie celular

Para conocer la localización subcelular de *Mtl2p* y *Wsc1p*, fusionamos la secuencia codificante para *Mtl2p* y *Wsc1p* en fase con la secuencia que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) en un plásmido de expresión en levaduras (ver Materiales y Métodos, Apartado 6.2.1). La proteína verde fluorescente se excita con luz ultravioleta y

emite una fluorescencia verde que podemos observar al microscopio (Chalfie et al., 1994; Shaner et al., 2005). De esta forma podemos detectar la proteína de fusión resultante (*Mtl2*-GFPp y *Wsc1*-GFPp) “in vivo” en las células.

### 6.1 Construcción de las cepas *Mtl2p*-GFP y *Wsc1*-GFP

Para introducir la GFP en fase dentro de los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>, en primer lugar tuvimos que eliminar el sitio *NotI* del “polilinker” de los plásmidos pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC2) y pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (pCL10). A continuación y por mutagénesis dirigida introdujimos un sitio *NotI* en el extremo carboxilo-terminal, justo antes del codón de parada de las ORFs correspondientes a los genes *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>. En este sitio *NotI* clonamos el gen que codifica la GFP y obtuvimos los plásmidos pSC7 (pAL-

*mtl2*<sup>+</sup>GFP) y pCL15 (pAL-*wsc1*<sup>+</sup>GFP).

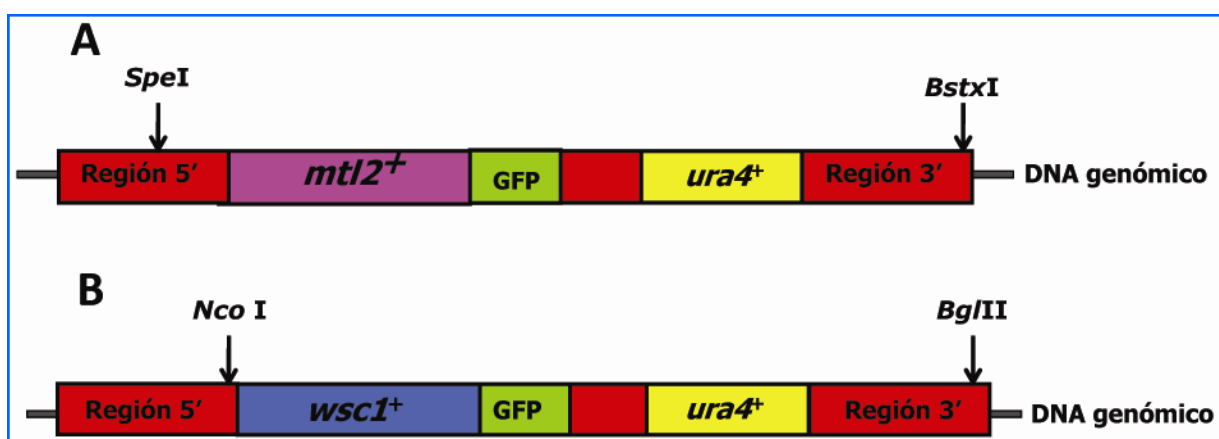
Las células del mutante *mtl2*Δ que llevaban el plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup>GFP y las células *wsc1*Δ transformadas con el plásmido pAL-*wsc1*<sup>+</sup>GFP, crecieron como células silvestres en placas con diferentes concentraciones de caspofungina (0,25 y 0,5 μg/ml), indicando que las proteínas de fusión son totalmente funcionales.

No obstante, para evitar que la presencia de varias copias de Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP pudiese alterar su localización, realizamos el mismo estudio marcando únicamente la copia endógena.

Para obtener la cepa Mtl2p-GFP (SC167), partimos del plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup>GFP (pSC7) al que se le introdujo un sitio *Sma*I por mutagénesis, obteniendo el plásmido pSC14. Posteriormente en este plásmido (pSC14) se insertó el gen *ura4*<sup>+</sup> en los sitios *Sma*I/*Hinc*II y lo denominamos

pSC19, que lleva la ORF de *mtl2*<sup>+</sup> marcada con GFP con su secuencia terminadora, el marcador de selección *ura4*<sup>+</sup> y secuencia del extremo 3' no traducido de *mtl2*<sup>+</sup> (figura 42-A). A partir de esta construcción, obtuvimos un fragmento de 5,7 kb que utilizamos para transformar la cepa silvestre YS64 y para integrar en el genoma de la levadura la copia del gen *mtl2*<sup>+</sup> marcada con GFP.

Para obtener la cepa Wsc1p-GFP (GRG42) el procedimiento fue similar al descrito para Mtl2p-GFP. Partimos del plásmido pRZ20 (pAL-*wsc1*<sup>+</sup>GFP con un sitio *Sma*I metido por mutagénesis aproximadamente a 200 pares de bases (pb) después del final del gen). En el sitio *Sma*I de pRZ20 clonamos el marcador *ura4*<sup>+</sup> creando pRZ21. A continuación digerimos este plásmido con las enzimas de restricción *Nco*I-*Bgl*III y obtuvimos un fragmento lineal 3,2 kb que lleva el gen *wsc1*<sup>+</sup> fusionado a GFP y marcado con el gen *ura4*<sup>+</sup>, que utilizamos para transformar la estirpe



**Figura 42.** Esquema de la estrategia empleada para la construcción de las cepas *mtl2*<sup>+</sup>GFP (SC167) y *wsc1*<sup>+</sup>GFP (GRG42). **A** - Para obtener la cepa Mtl2p-GFP partimos del plásmido pAL-*mtl2*<sup>+</sup>GFP en el que introdujimos por mutagénesis un sitio *Sma*I aproximadamente 300 pares de bases (pb) después del final del gen. En el sitio *Sma*I clonamos el gen *ura4*<sup>+</sup> obteniendo así pSC19. A continuación digerimos pSC19 con las enzimas de restricción *Spe*I-*Bst*xI y obtuvimos un fragmento de 5,7 kb que lleva el gen *mtl2*<sup>+</sup> fusionado a GFP y marcado con el gen *ura4*<sup>+</sup> con el que transformamos la cepa silvestre YS64. **B** - Para obtener la cepa Wsc1p-GFP partimos del plásmido pRZ21 que lleva la región promotora y terminadora del gen *wsc1*<sup>+</sup>, la ORF del gen en fase con la GFP y el gen *ura4*<sup>+</sup>. El fragmento *Nco*I-*Bgl*III de 3,2kb se utilizó para transformar la cepa silvestre YS64.

silvestre YS64 (**figura 42-B**).

### 6.2 Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP se localizan en la superficie celular

Tal y como aparece en la **figura 43-A**, en la cepa que lleva Mtl2p-GFP integrada, la fluorescencia es intensa y se distribuye por toda la periferia de la célula y en el septo. Esta distribución es consistente con la “posible localización” de Mtl2p en la membrana plasmática. Mtl2p-GFP no parece localizarse en zonas específicas de la superficie celular; aunque la fluorescencia fue un poco más intensa en los polos y en el área media en células en interfase o premitóticas (célula señalada con una flecha blanca en la **figura 43-A**). Además, Mtl2p-GFP aparece también bastante marcada en las cicatrices de división después de la separación celular (marcadas con una flecha blanca en la **figura 43-A**).

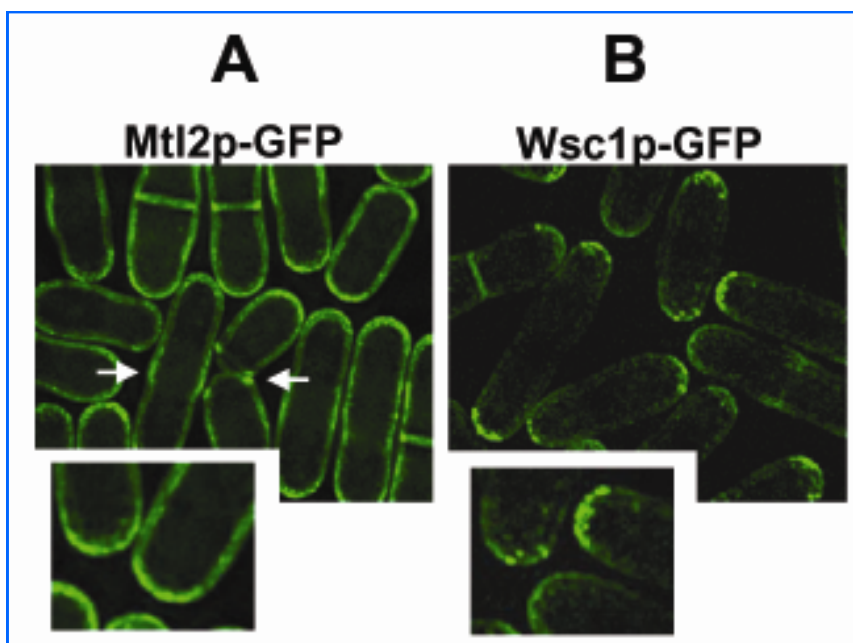
Wsc1p-GFP también se encuentra en la superficie pero aparece mucho más

concentrada en “pequeños gránulos” en los polos de la célula (**figura 43-B**).

### 6.3 La localización de Wsc1p depende del crecimiento polarizado

Para determinar si la localización de Wsc1p-GFP estaba relacionada con el crecimiento polarizado realizamos una tinción con calcoflúor, que marca las zonas de crecimiento activo de la célula. En la **figura 44-A** observamos que Wsc1p-GFP aparece en un solo polo cuando la célula está creciendo de forma monopolar y en ambos polos cuando las células han activado NETO y crecen de forma bipolar.

También nos preguntamos si la localización de Wsc1p-GFP dependía de los marcadores de polaridad. Analizamos el patrón de localización de Wsc1p-GFP en células que carecen del marcador de polaridad Tea4p, estas células no activan el crecimiento por el polo nuevo y crecen de forma monopolar (Martin et al., 2005; Tätebe



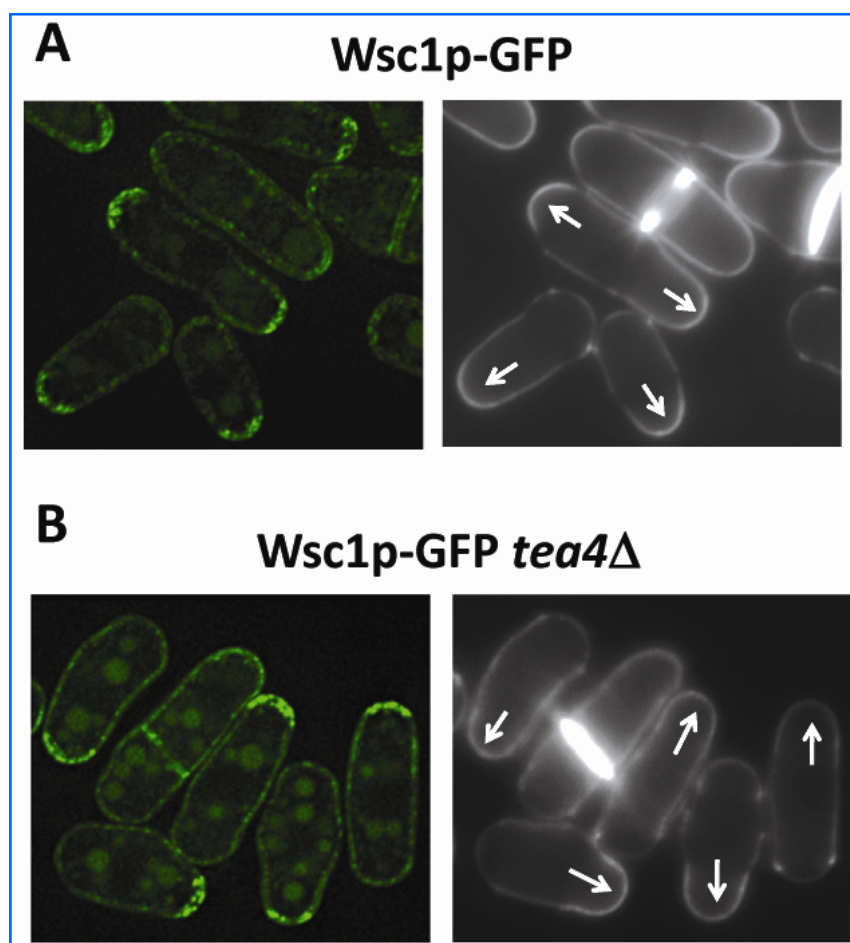
**Figura 43.** Localización subcelular de Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP. **A**-Mtl2p-GFP se localiza por toda la membrana. **B** -Wsc1p-GFP se concentra en los polos. Se utilizaron las cepas Mtl2p-GFP (SC167) y Wsc1p-GFP (GRG42) que llevan la proteína endógena fusionada a GFP. Las células de la fotografía crecieron en YES líquido a 28° y las fotografías se realizaron en un microscopio de fluorescencia Deltavision.

et al., 2005). Para ello obtuvimos una cepa *tea4Δ* en la que la copia endógena de *wsc1<sup>+</sup>* está marcada con GFP (SC252). Wsc1p-GFP se localiza casi exclusivamente en el polo que crece en el mutante *tea4Δ* mientras que se sitúa en ambos polos en la cepa silvestre (**figura 44-B**).

Estos resultados sugieren que Wsc1p se localiza de forma polarizada y que podría formar parte de complejos con otras proteínas en las zonas de crecimiento activo de la célula.

#### 6.4 Wsc1p-GFP no se localiza correctamente en el mutante *mtl2Δ*

Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP se distribuyen de manera algo diferente y curiosamente las células a las que les falta cualquiera de las dos moléculas son viables, pero si faltan ambas se mueren. Esto podría sugerir: i) que la asociación de Mtl2p-GFP o Wsc1p-GFP con ciertas estructuras no es esencial o ii) que al quitar uno de los “supuestos sensores” el otro lo sustituya y asuma al menos parcialmente la función que normalmente ejecutaría el que falta. Para comprobar esta segunda opción examinamos la distribución de cada una de estas proteínas en cepas en que la otra había sido eliminada.



**Figura 44.** Wsc1p-GFP se localiza de manera polarizada. **A-** Wsc1p-GFP se localiza en sitios de crecimiento activo coincidiendo con las zonas que se tiñen con Calcoflúor (flechas blancas). **B-** En un mutante *tea4Δ*, Wsc1p-GFP se localiza sólo en el polo que está creciendo, indicado con flechas blancas. Se utilizaron las cepas Wsc1p-GFP (GRG42) y Wsc1p-GFP *tea4Δ* (SC252) obtenida por cruce a partir de las cepas GRG42 (Wsc1p-GFP h<sup>+</sup>) y PG442 (*tea4::kanMX6* h<sup>+</sup>). Las células se incubaron en medio rico a 28°C, se lavaron una vez con agua y se tiñeron con calcoflúor (Cf) para su observación al microscopio de fluorescencia Deltavision.

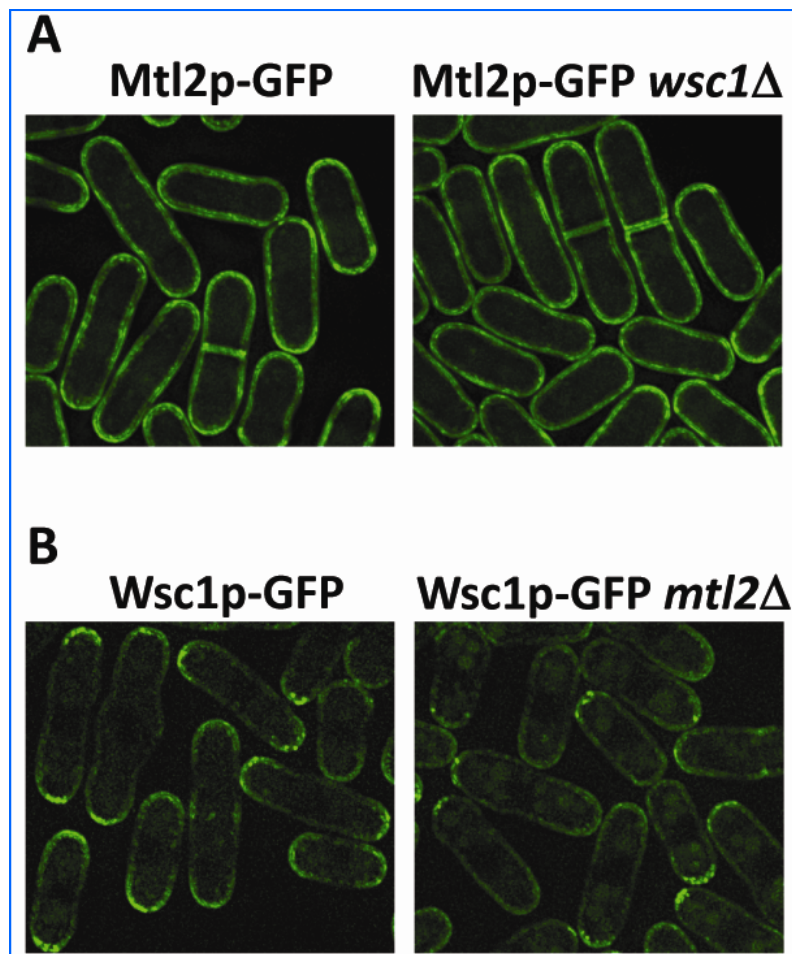


En la **figura 45-A** se muestra que la distribución e intensidad de la señal de Mtl2p-GFP es muy parecida en la cepa silvestre y en la que ha sido deletado el gen *wsc1*<sup>+</sup>. Por el contrario, la intensidad de la señal de Wsc1p-GFP en los mutantes *mtl2*Δ es menor que en la cepa silvestre. Además en la mayoría de las células, la fluorescencia aparece sólo en uno de polos (**figura 45-B**). Estos resultados no resuelven ninguna de las preguntas que nos planteamos, sin embargo sí parece claro que no existe un cambio de localización drástico de ninguna de las dos proteínas en los mutantes de la otra que indique que podría funcionar en su lugar.

### 6.5 La localización polarizada

#### de Wsc1p depende del citoesqueleto de actina

Viendo que puede existir una relación entre Wsc1p y el crecimiento polarizado, nos preguntamos si la localización subcelular de Mtl2p-GFP y/o Wsc1p-GFP depende de la organización del citoesqueleto de actina. Para ello sometimos a las células que llevan la copia genómica de Mtl2p y Wsc1p marcada con GFP (SC167 y GRG42 respectivamente) a tratamiento con Latrunculina A. La Latrunculina A despolimeriza los cables de actina (Spector et al., 1989). Como control del experimento usamos una cepa con la proteína coronina marcada con GFP (Crn1p-GFP), esta proteína está asociada a la F-actina y se usa



**Figura 45.** **A** Mtl2p-GFP se localiza correctamente cuando está deletado *wsc1*<sup>+</sup>. **B** En ausencia de Mtl2p, disminuye la intensidad de la señal de Wsc1p-GFP y en la mayoría de las células se observa en forma de puntos en uno de los polos. La cepa Mtl2p-GFP *wsc1*Δ (SC254) se obtuvo por cruce a partir de las cepas Mtl2p-GFP h<sup>-</sup> (SC167) y *wsc1*Δ h<sup>+</sup> (GRG12). La cepa Wsc1p-GFP *mtl2*Δ (SC256) se obtuvo por cruce a partir de las cepas Wsc1p-GFP h<sup>-</sup> (GRG42) y *mtl2*Δ h<sup>+</sup> (YS1215). Las células crecieron en medio rico a 28°C y se observaron en el microscopio de fluorescencia Deltavision.

como marcador de los parches de F-actina (Pelham and Chang, 2002; Pelham and Chang, 2001).

30 minutos después de añadir Latrunculina A (100 $\mu$ M), la proteína Mtl2p-GFP se localiza por toda la membrana prácticamente igual que en las células control con DMSO (sin Latrunculina) (**figura 46**, paneles de la izquierda). Sin embargo, en las mismas condiciones, es decir en presencia de Latrunculina A 100 $\mu$ M, la coronina prácticamente ha desaparecido (**figura 46**, paneles de la derecha).

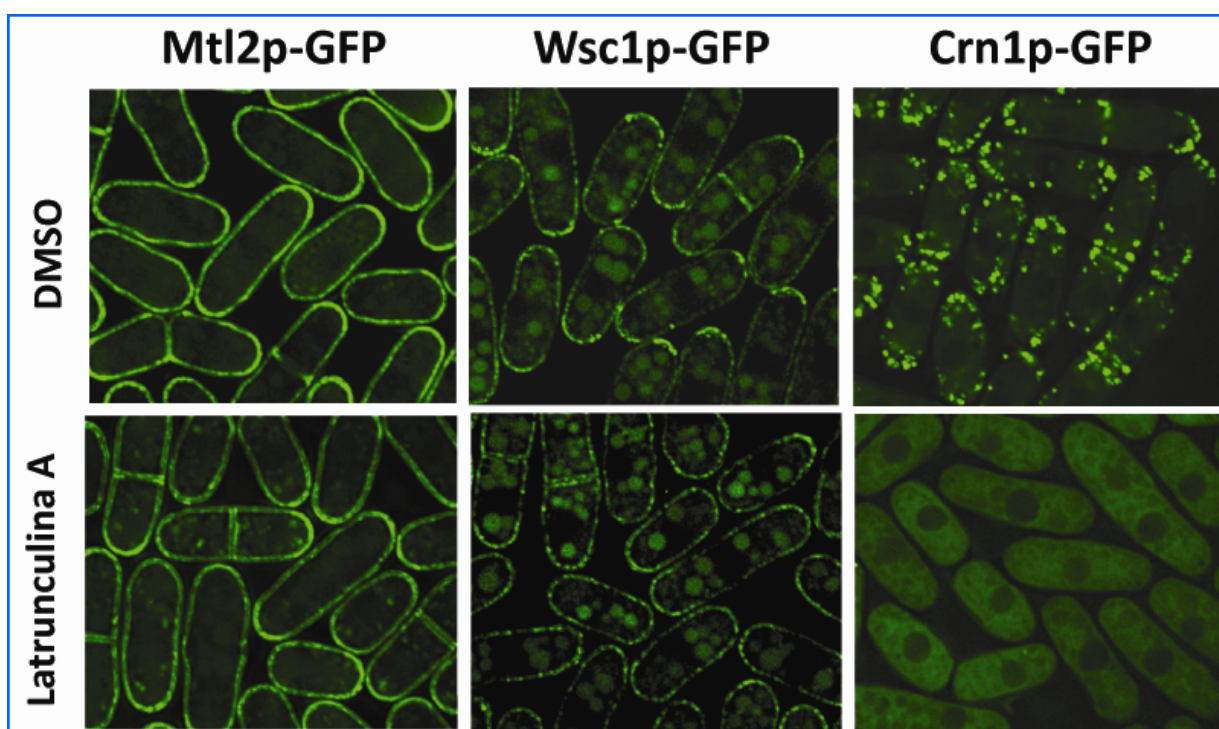
Cuando realizamos un experimento similar al anterior pero en este caso para ver la distribución de Wsc1p-GFP en presencia de Latrunculina A, observamos que la

intensidad de la señal de Wsc1p-GFP disminuye un poco y se dispersa por toda la membrana en lugar de concentrarse en los polos (**figura 46**, paneles centrales).

Estos resultados indican que mientras que la localización de Mtl2p-GFP no depende del citoesqueleto de actina, para que Wsc1p-GFP se localice de forma polarizada es preciso que la actina esté correctamente polimerizada.

## 6.6 La localización de Mtl2p y Wsc1p no depende del transporte de microtúbulos

También observamos la localización de las proteínas Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP en



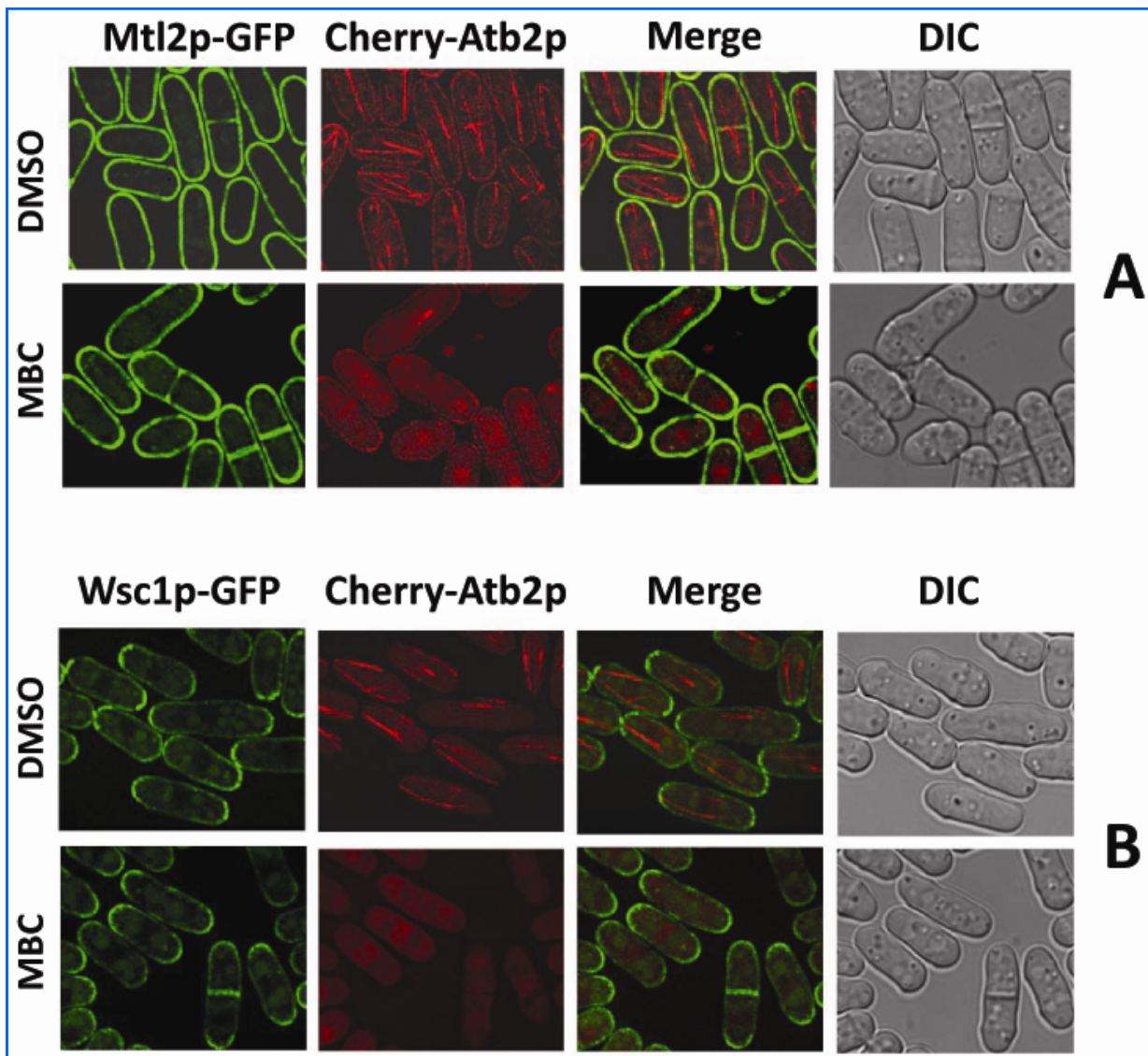
**Figura 46.** Microscopía de fluorescencia de células en las que se muestra la distribución de Mtl2p-GFP (SC167) (paneles de la izquierda) y Wsc1p-GFP (GRG42) (paneles centrales) en presencia o ausencia de Latrunculina A (100 $\mu$ M). Utilizamos como control la cepa Crn1p-GFP (JCRsp962) (paneles de la derecha). En todos los casos las células se recogieron en fase logarítmica y se incubaron durante 30 minutos con 1% de DMSO (paneles superiores) o 100 $\mu$ M Lat.A en 1% DMSO (paneles inferiores).



presencia de metil-benzimidazol-carbamato (MBC), una droga que despolimeriza los microtúbulos. En *S. pombe* los microtúbulos son esenciales para mantener la morfología celular ya que intervienen en el establecimiento de los lugares de crecimiento polarizado (Chang and Martin, 2009).

Para realizar este experimento

construimos las cepas *wsc1<sup>+</sup> GFP:ura4<sup>+</sup> aur-cherry Atb2* (SC240) y *mtl2<sup>+</sup> GFP:ura4<sup>+</sup> aur-cherry Atb2* (SC242) que llevan las proteínas Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP, respectivamente y la proteína Atb2p ( $\alpha$ -tubulina) de los microtúbulos marcados en rojo (Cherry). Después de 20 minutos de tratamiento con MBC, los microtúbulos prácticamente han desaparecido, sin embargo las proteínas



**Figura 47.** Localización de Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP en presencia de MBC. **A** Microscopía de fluorescencia de células Mtl2p-GFP (verde) Cherry-Atb2p (rojo) (SC242) y de contraste interferencial (paneles de la derecha). **B** Microscopía de fluorescencia de células Wsc1p-GFP (verde) Cherry-Atb2p (rojo) (SC240) y de contraste interferencial (paneles de la derecha). En ambos casos las células se recogieron en fase logarítmica y se incubaron durante 20 minutos con 1% de DMSO (paneles superiores) o 25µg/ml de MBC (paneles inferiores).

Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP se localizan correctamente, Mtl2p-GFP por toda la membrana (**figura 47-A**) y Wsc1p-GFP concentrada en los polos de la célula (**figura 47-B**), lo que indica que la localización periférica de estas proteínas es independiente del transporte de microtúbulos.

## 7. La activación de Rho1p suprime el fenotipo de sensibilidad a caspofungina de los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* y rescata el crecimiento de las células con bajos niveles de Mtl2p y Wsc1p

### 7.1 Rho1p y sus GEFs Rgf1p y Rgf2p suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*

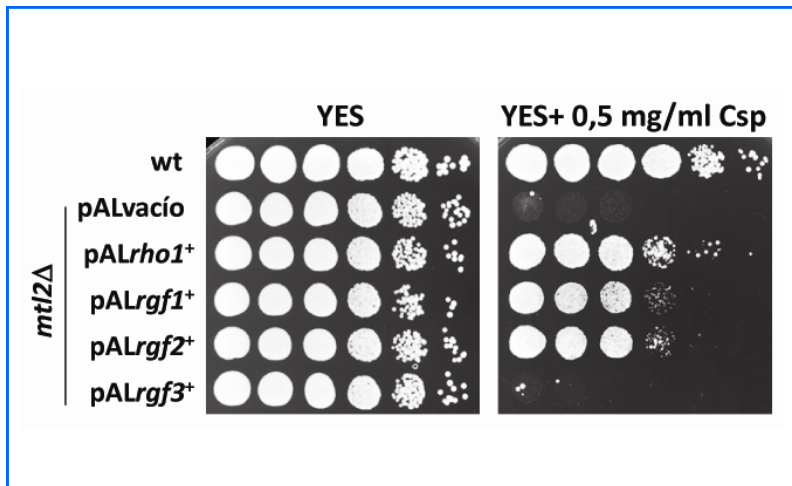
Hemos visto anteriormente que las células con niveles muy bajos de Mtl2p y Wsc1p se lisan de manera similar a las células con muy poca cantidad Rho1p (ver Apartado 4). Para definir una posible relación entre Mtl2p y Wsc1p y la ruta de señalización de la GTPasa Rho1p, nos preguntamos si la sobreexpresión de Rho1p o de cualquiera de sus activadores (Rho1-GEFs) podría suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante nulo *mtl2Δ*. Para ello transformamos la cepa YS1220 (*mtl2Δ*) con los plásmidos pAL-*rho1*<sup>+</sup>, pAL-*rgf1*<sup>+</sup>, pAL-*rgf2*<sup>+</sup> y pAL-*rgf3*<sup>+</sup> (plásmidos multicopia en los que cada gen se encuentra bajo el control de su propio promotor). Seleccionamos los transformantes en MM-leu y analizamos su crecimiento en

placas de medio rico con diferentes concentraciones de caspofungina. Como se muestra en la **figura 48**, una expresión moderada de *rho1*<sup>+</sup>, *rgf1*<sup>+</sup> y *rgf2*<sup>+</sup> restablece el crecimiento en el mutante *mtl2Δ* en presencia del agente antifúngico, mientras que la sobreexpresión de *rgf3*<sup>+</sup> no suprime este defecto (**figura 48**).

*rgf3*<sup>+</sup> codifica un activador de Rho1p que se expresa exclusivamente durante la citocinesis y es uno de los genes cuya expresión está regulada por el factor de transcripción Ace2p (Rustici et al., 2004). Nos preguntamos si la expresión de *rgf3*<sup>+</sup> bajo el control de un promotor no regulado por Ace2p como es el promotor *nmt1*, que es un promotor fuerte y regulado por tiamina podría proporcionar unos niveles suficientes de Rho1p que suprimieran el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina en el mutante *mtl2Δ*.

Realizamos un experimento similar al anterior pero en este caso utilizamos plásmidos pREP3X-*rho1*<sup>+</sup>, pREP3X-*rgf1*<sup>+</sup>, pREP3X-*rgf2*<sup>+</sup>, pREP3X-*rgf3*<sup>+</sup> y pREP3X vacío (como control), en los que la expresión de cada uno de los genes está bajo el control del promotor *nmt1* (Maundrell, 1993). Con ellos transformamos la cepa mutante *mtl2Δ* (YS1220) y seleccionamos los transformantes en MM-leu con tiamina para mantener apagado el promotor.

En la **figura 49** (paneles superiores) se puede observar que en las placas de MM+tiamina suplementadas con caspofungina, en las que el promotor *nmt1* está reprimido, incluso las células que sobreexpresan *rgf3*<sup>+</sup> son capaces de crecer en presencia del antifúngico. Sin embargo, en

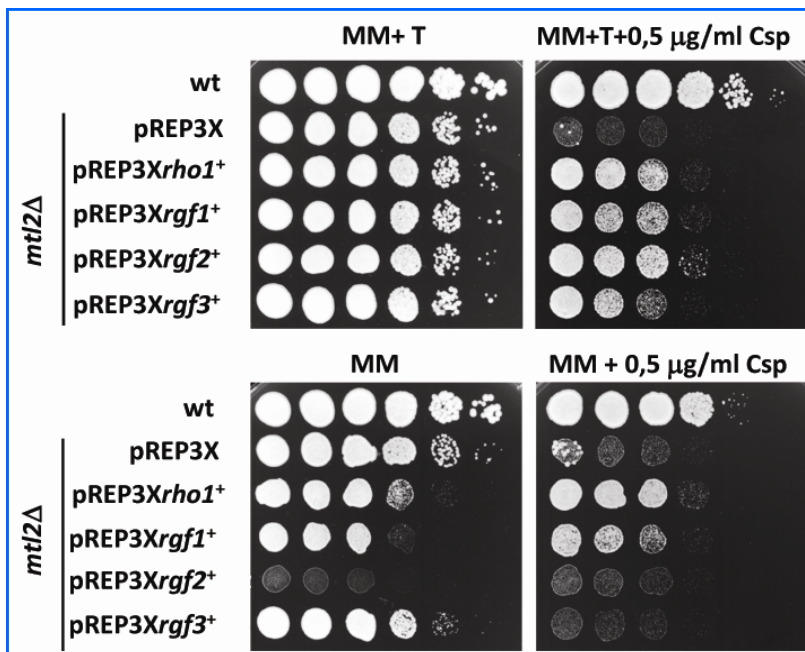


**Figura 48.** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina de la cepa *mtl2Δ* (YS1220) transformada con los plásmidos pAL*rho1*<sup>+</sup>, pAL*rgf1*<sup>+</sup>, pAL*rgf2*<sup>+</sup> y pAL*rgf3*<sup>+</sup>. Se realizaron diluciones seriadas (con 8x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>2</sup> y 2x10<sup>1</sup> cels/ml) y aproximadamente 3μl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES suplementado con caspofungina (0,5 μg/ml). Como control se utilizó la cepa silvestre que no es sensible a esa concentración del antifúngico y la cepa YS1220 transformada con el vector vacío que es hipersensible a caspofungina. Las placas se incubaron a 28°C durante tres días.

placas de MM suplementadas con caspofungina (figura 49, panel inferior derecho), en las que el promotor está desreprimido permitiendo la expresión de los genes, sólo las células que sobreexpresan *rho1*<sup>+</sup> y *rgf1*<sup>+</sup> son capaces de crecer.

La sobreexpresión de *rgf2*<sup>+</sup> es letal tanto en el mutante *mtl2Δ* (figura 49, panel inferior izquierdo) como en la cepa silvestre (García et al., 2009a), por lo tanto no es de

extrañar que no suprima el defecto de hipersensibilidad del mutante *mtl2Δ*. Sin embargo, aunque la sobreexpresión de *rgf3*<sup>+</sup> no es letal tampoco mejora el crecimiento del mutante nulo (*mtl2Δ*) en presencia del antifúngico. La sobreexpresión de *rgf3*<sup>+</sup> produce defectos en la división celular, con células alargadas y en algunos casos multiseptadas (Tajadura et al., 2004); este efecto podría sumarse al de una pared más débil y sensibilidad a diferentes tipos de



**Figura 49.** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ* por Rho1p y sus activadores. Células *mtl2Δ* (YS1220) fueron transformadas con los plásmidos pREP3*xrho1*<sup>+</sup>, pREP3*xrgf1*<sup>+</sup>, pREP3*xrgf2*<sup>+</sup> y pREP3*xrgf3*<sup>+</sup>. Se realizaron diluciones seriadas (8x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>2</sup> y 2x10<sup>1</sup> cels/ml) y aproximadamente 3μl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de MM+T (Tiamina) (control), MM+T+caspofungina (0.5μg/ml) (Paneles superiores), MM (control) y MM+caspofungina (0.5 μg/ml) (Paneles inferiores). Como control se ha usado la cepa silvestre que no es sensible a esa concentración del antifúngico y la cepa *mtl2Δ* (YS1220) transformada con el vector vacío que sí es hipersensible a caspofungina. En todos los casos las placas se incubaron a 28°C durante tres días.

estrés que presentan las células *mtl2Δ*.

También nos preguntamos si alguna de las otras GTPasas de la familia Rho sería capaz de suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*. Realizamos un experimento similar a los descritos anteriormente, en el que valoramos la sensibilidad a caspofungina de la cepa *mtl2Δ* transformada con los plásmidos: pAL-*rho1*<sup>+</sup>, pAL-*rho2*<sup>+</sup>, pAL-*rho3*<sup>+</sup>, pAL-*rho4*<sup>+</sup>, pAL-*rho5*<sup>+</sup> y pAL-*cdc42*<sup>+</sup>. Ninguno de los plásmidos, excepto pAL-*rho1*<sup>+</sup> (control positivo) y pAL-*rho5*<sup>+</sup>, restablecieron el crecimiento del mutante *mtl2Δ* en presencia del antifúngico (datos no mostrados).

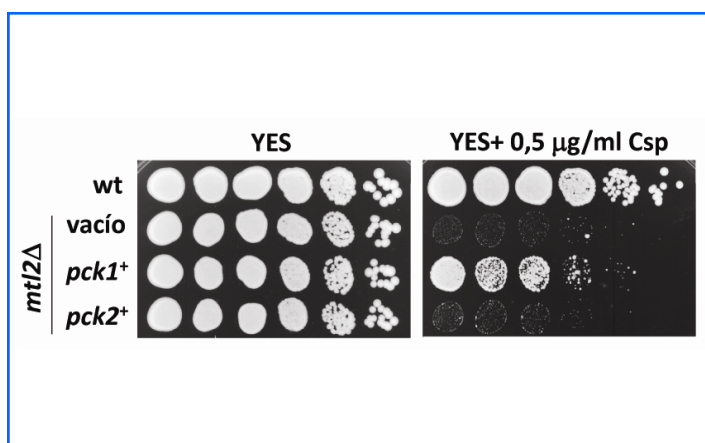
### 7.2 *pck1*<sup>+</sup> suprime el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*

Al ver que la sobreexpresión de Rho1p suprime la hipersensibilidad a caspofungina en el mutante nulo *mtl2Δ*, nos preguntamos si la sobreexpresión de alguno de sus efectores podría actuar de manera similar.

Los homólogos de la protein kinasa C

(Pkc1p en *S. cerevisiae*) en *S. pombe*, Pck1p y Pck2p, son efectores de Rho1p (Arellano et al., 1999b); ambos genes -*pck1*<sup>+</sup> y *pck2*<sup>+</sup>- tienen una función redundante en la viabilidad celular. La eliminación de Pck1p o Pck2p por separado no es letal; en cambio las cepas *pck1Δ pck2Δ* son inviables (Toda et al., 1993). Pck2p también regula la cascada de MAPK de integridad (Ma et al., 2006). La regulación ejercida por Pck1p y Pck2p sobre los genes que participan en la biosíntesis de la pared celular parece ser diferente y muy poco conocida; por ejemplo, los mutantes *pck1Δ* son sensibles a equinocandina y los mutantes *pck2Δ* no lo son, además múltiples copias de *pck2*<sup>+</sup> no pueden suprimir este fenotipo (Arellano et al., 1999b).

Transformamos la cepa *mtl2Δ* (YS1220) con los plásmidos multicopia pDB248-*pck1*<sup>+</sup> y pDB248-*pck2*<sup>+</sup> (Toda et al., 1993), portadores de *pck1*<sup>+</sup> y *pck2*<sup>+</sup> bajo el control de su propio promotor, seleccionamos los transformantes en MM sin leucina y posteriormente realizamos un ensayo de hipersensibilidad a caspofungina (0,5μg/ml). Como se demuestra en la **figura 50**, solamente la expresión moderada de *pck1*<sup>+</sup> restablece el crecimiento del mutante



**Figura 50.** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ* por Pck1p y Pck2p. Las células del mutante *mtl2Δ* (YS1220) fueron transformadas con los plásmidos pDB248-*pck1*<sup>+</sup> y pDB248-*pck2*<sup>+</sup>. Como control se han usado la cepa silvestre que no es sensible a esa concentración del antifúngico y la cepa *mtl2Δ* (YS1220) transformada con el vector pDB248, sensible a caspofungina. Se realizaron diluciones seriadas 8x10<sup>4</sup>, 4x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>4</sup>, 2x10<sup>3</sup>, 2x10<sup>2</sup> y 2x10<sup>1</sup> cels/ml) y aproximadamente 3μl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES+caspofungina (0,5 μg/ml) las cuales se incubaron a 28°C durante tres días.



nulo *mtl2Δ* en presencia del antifúngico.

### 7.3 La sobreexpresión de las proteínas de la familia de las β-glucán sintasas suprimen parcialmente el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*

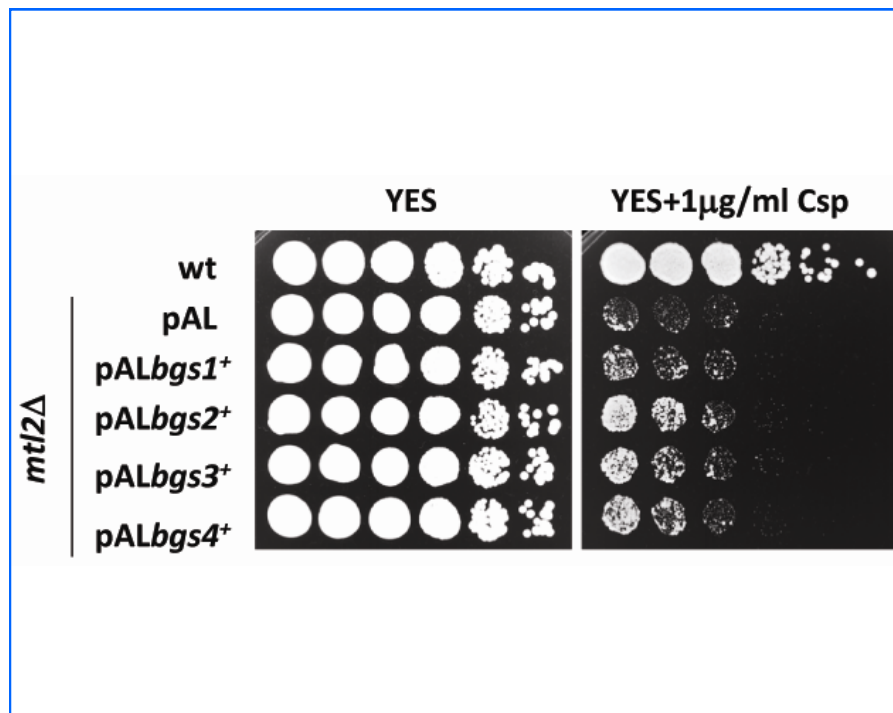
También nos preguntamos si la sobreexpresión de otros efectores de Rho1p, como son los genes *bgs1<sup>+</sup>*, *bgs2<sup>+</sup>*, *bgs3<sup>+</sup>* y *bgs4<sup>+</sup>* que codifican las subunidades catalíticas de la enzima β-GS, suprimirían la sensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*. Para ello transformamos la cepa *mtl2Δ* (YS1220), con los plásmidos multicopia pAL-*bgs1<sup>+</sup>*, pAL-*bgs2<sup>+</sup>*, pAL-*bgs3<sup>+</sup>* y pAL-*bgs4<sup>+</sup>*, que llevan los genes *bgs* correspondientes con sus secuencias promotoras y terminadoras. Los transformantes fueron seleccionados en MM-

leu y posteriormente su crecimiento fue analizado en placas de medio rico con caspofungina.

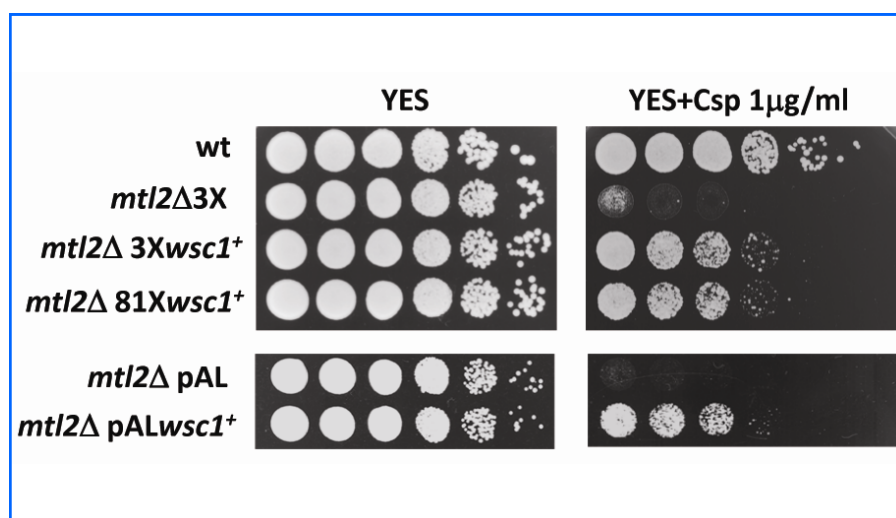
Como se muestra en la **figura 51**, una expresión moderada de *bgs2<sup>+</sup>*, *bgs3<sup>+</sup>* y *bgs4<sup>+</sup>* restablece, aunque sólo parcialmente, el crecimiento en el mutante *mtl2Δ* en presencia del agente antifúngico. Estos datos son difíciles de interpretar puesto que parece que un aumento de cada subunidad por separado no es suficiente para restablecer totalmente el crecimiento, sin embargo quizás la sobreexpresión de varias de las subunidades a la vez sí lo mejoraría.

### 7.4 La sobreexpresión de Wsc1p suprime el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*

Mtl2p y Wsc1p tienen una función redundante en la viabilidad celular, ambos se



**Figura 51.** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina de la cepa *mtl2Δ* (YS1220) por las β-GSs. Células de genotipo *mtl2Δ* fueron transformadas con los plásmidos pAL*bgs1<sup>+</sup>*, pAL*bgs2<sup>+</sup>*, pAL*bgs3<sup>+</sup>* y pAL*bgs4<sup>+</sup>*. Se realizaron diluciones seriadas (con  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y aproximadamente 3μl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES suplementado con caspofungina (1 μg/ml). Como control se utilizó la cepa silvestre (YS64) que no es sensible a esa concentración del antifúngico y la cepa *mtl2Δ* (YS1220) transformada con el vector vacío (pAL) que sí es hipersensible a caspofungina. Las placas se incubaron a 28°C durante tres días.



**Figura 52:** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad de la cepa *mtl2Δ* transformada con los plásmidos -pREP3x, pREP3x-*wsc1*<sup>+</sup> (pRZ16) y pREP81x-*wsc1*<sup>+</sup> (pRZ17) (Paneles superiores); pAL y pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (pCL10) (Paneles inferiores). Se realizaron diluciones seriadas (con  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y aproximadamente 3  $\mu$ l de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES + caspofungina (1  $\mu$ g/ml). Las placas se incubaron a 28°C durante tres días.

localizan en la periferia de la célula y presentan una distribución de dominios similar. Existen distintas posibilidades en cuanto a la organización de una “posible ruta” en la que los dos puedan funcionar. 1) que Mtl2p esté bajo el control de Wsc1p de manera que su sobreexpresión active la ruta, 2) que Mtl2p actúe positivamente para regular a Wsc1p, 3) alternativamente ambos pueden actuar en paralelo regulando la integridad de forma parcialmente redundante. Para responder a ésta y a otras preguntas, en primer lugar analizamos si un aumento de Wsc1p podría compensar el defecto de integridad causado por la pérdida de Mtl2p.

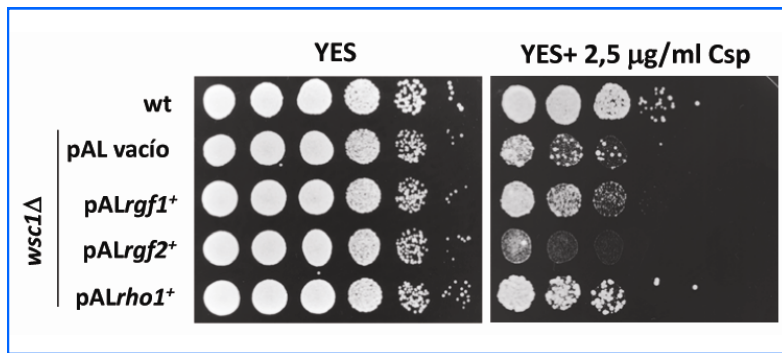
Para ello clonamos el gen *wsc1*<sup>+</sup> bajo el control del promotor *nmt1* en el vector pREP3X (alto nivel de expresión) y en el vector pREP81X (bajo nivel de expresión) (Ver apartado 4.10 de Materiales y Métodos). Utilizamos ambos plásmidos de sobreexpresión (pREP3X *wsc1*<sup>+</sup> (pRZ16) y pREP81X *wsc1*<sup>+</sup> (pRZ17) y el plásmido pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (pCL10) que lleva el gen *wsc1*<sup>+</sup> bajo el control de su propio promotor para transformar la cepa *mtl2Δ* (YS1220).

Seleccionamos los transformantes en placas de MM sin leucina y con tiamina para mantener el promotor *nmt1* reprimido y realizamos un ensayo de hipersensibilidad a caspofungina en placas de medio rico (YES). Sabemos que en ausencia de tiamina la sobreexpresión de Wsc1p es letal (Ver apartado 9.2).

Sorprendentemente, en medio rico (promotor apagado) los dos plásmidos (pREP3X-*wsc1*<sup>+</sup> y pREP81X-*wsc1*<sup>+</sup>) suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ*. Además la sobreexpresión moderada del gen *wsc1*<sup>+</sup> (pAL-*wsc1*<sup>+</sup>) suprime igualmente este fenotipo (figura 52).

### 7.5 La sobreexpresión de *rho1*<sup>+</sup> y *rgf1*<sup>+</sup> suprimen parcialmente el fenotipo de sensibilidad a caspofungina del mutante *wsc1Δ*

Para continuar respondiendo a las preguntas planteadas en el apartado anterior también analizamos si la sobreexpresión de Rho1p o alguno de sus GEFs (Rgf1p y



**Figura 53.** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina de la cepa *wsc1Δ* (GRG15) transformada con los plásmidos pAL-*rgf1*<sup>+</sup>, pAL-*rgf2*<sup>+</sup> y pAL-*rho1*<sup>+</sup>, bajo el control de su propio promotor y pAL vacío como control. Se realizaron diluciones seriadas ( $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y se sembraron en placas de YES y YES suplementado con caspofungina (2,5 μg/ml) y se incubaron a 28°C durante tres días.

Rgf2p) podían suprimir el fenotipo de sensibilidad a caspofungina del mutante *wsc1Δ*.

Para ello transformamos la cepa *wsc1Δ* (GRG15) con los plásmidos pAL-*rgf1*<sup>+</sup>, pAL-*rgf2*<sup>+</sup> y pAL-*rho1*. Los transformantes fueron seleccionados en MM-leu y posteriormente su crecimiento fue analizado en placas de medio rico con diferentes concentraciones de caspofungina. Como se puede observar en la **figura 53**, sólo la sobreexpresión moderada de Rho1p y Rgf1p, suprime parcialmente la hipersensibilidad a caspofungina de las células *wsc1Δ*.

Para descartar la posibilidad de que esta complementación “precaria” fuera debida a una falta de activación de Rho1p, probamos si el alelo constitutivamente activo de Rho1p (Rho1G15V) suprimiría mejor el fenotipo del mutante *wsc1Δ*. El resultado obtenido al utilizar el plásmido (pAL-*rho1*<sup>+</sup>G15V) en el que *rho1*<sup>+</sup> se encuentra regulado por su propio promotor fue muy parecido al que se muestra en la **figura 53** para pAL-*rho1*<sup>+</sup> (datos no mostrados).

### 7.6 Solo la sobreexpresión de *mtl2*<sup>+</sup> suprime parcialmente el fenotipo de sensibilidad a

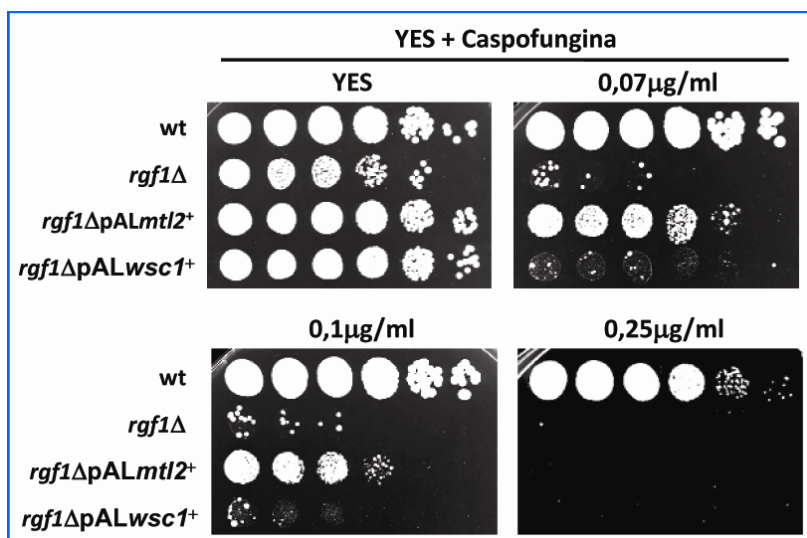
### caspofungina del mutante *rgf1Δ*

Hemos visto anteriormente que un pequeño aumento de uno de los GEF de la GTPasa Rho1p, *rgf1*<sup>+</sup>, era capaz de suprimir el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante nulo *mtl2Δ* y sólo parcialmente el del mutante *wsc1Δ*. Por ello nos preguntamos qué sucedería a la inversa, o sea, si la sobreexpresión de Mtl2p o Wsc1p suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante nulo *rgf1Δ*.

El mutante *rgf1Δ* es muy sensible a caspofungina, prácticamente no crece a partir de 0,02μg/ml y este fenotipo es suprimido por la sobreexpresión de Rho1p (García et al., 2006).

Transformamos la cepa *rgf1Δ* (PG327) con los plásmidos multicopia pAL-*mtl2*<sup>+</sup> (pSC2) y pAL-*wsc1*<sup>+</sup> (pCL10). Los transformantes fueron seleccionados en MM-leu y su crecimiento fue analizado en placas de medio rico con diferentes concentraciones de caspofungina. Como se muestra en la **figura 54** sólo la sobreexpresión de Mtl2p es capaz de rescatar el crecimiento de la cepa *rgf1Δ* pero a bajas concentraciones de caspofungina (0,07 y 0,1μg/ml). A partir de





**Figura 54.** Ensayo de complementación del fenotipo de hipersensibilidad a Caspofungina de la cepa *rgf1Δ* (PG327) transformada con los plásmidos *pALmtl2+* y *pALwsc1+*. Se realizaron diluciones seriadas (con  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y aproximadamente 3µl de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de YES y YES suplementado con caspofungina (0,07 µg/ml, 0,1 µg/ml y 0,25 µg/ml). Las placas se incubaron a 28°C durante tres días.

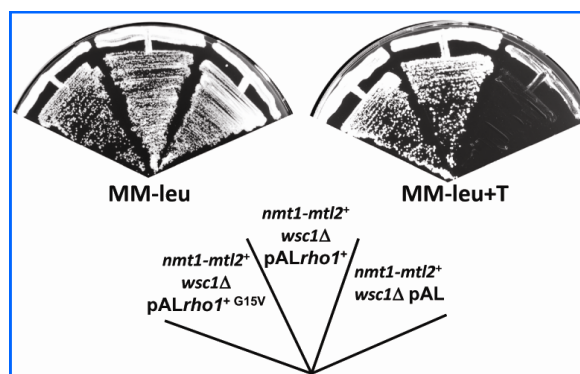
0,25µg/ml ya no suprime este fenotipo (figura 54). Según estos datos y otros que hemos obtenido anteriormente, *Mtl2p* podría estar actuando en paralelo con *Rgf1p*, mientras que en el caso de *Wsc1p* el resultado apunta a un papel en la misma vía de transducción de señales posiblemente por encima de *Rgf1p*.

### 7.7 Un aumento de la expresión de *rho1+* y *rgf1+* rescata el fenotipo de muerte celular que se produce en ausencia de *Mtl2p* y *Wsc1p*

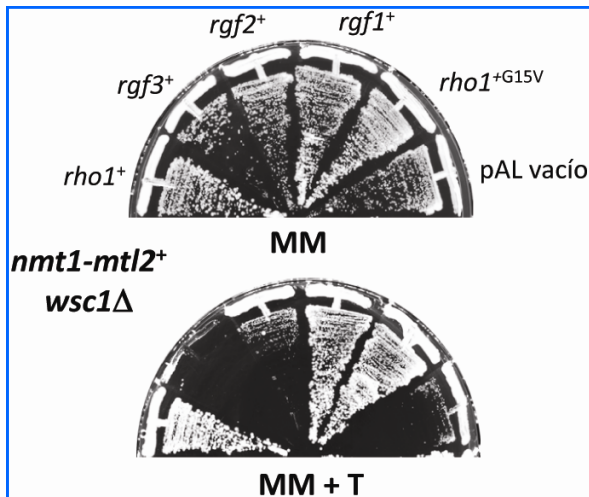
Hemos visto que el defecto de integridad celular del mutante *mtl2Δ* es suprimido casi totalmente al aumentar la expresión de *Rho1p*, de alguno de sus activadores y de alguno de sus efectores, así como por un aumento del otro “posible sensor”, definiendo una posible ruta de “salvamento” cuando se producen daños en la pared celular. Sin embargo, también nos preguntamos si la muerte producida como consecuencia de la pérdida simultánea de *Mtl2p* y *Wsc1p* podría ser superada por la

activación de *Rho1p* o de alguno de sus reguladores. Este dato confirmaría que efectivamente ambos “sensores” actúan por encima de *Rho1p*.

Para ello primero transformamos la cepa *P81nmt1-mtl2+ wsc1Δ* (SC82) (Apartado 4.1) con los plásmidos *pALrho1+*, *pALrho1G15V* (*Rho1p* activo constitutivamente). Como se muestra en la figura 55, ambos plásmidos rescatan eficientemente el crecimiento de la cepa



**Figura 55.** La cepa *P81nmt1-mtl2+ wsc1Δ* (SC82) fue transformada con los plásmidos *pALrho1+*, *pALrho1G15V* y *pAL*. Los transformantes se seleccionaron en placas de MM-leu y se estiraron en placas de MM-leu y MM-leu + tiamina (promotor apagado) y se incubaron a 28°C durante 3 días.



**Figura 56.** Células de la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC82) transformada con los plásmidos pAL vacío, pAL-*rho1<sup>+</sup>*, pAL-*rho1<sup>G15V</sup>*, pAL-*rgf1<sup>+</sup>*, pAL-*rgf2<sup>+</sup>* y pAL-*rgf3<sup>+</sup>*, fueron estriadas en MM sin tiamina (superior) y con tiamina (inferior) y se incubaron a 28°C durante 3 días.

*P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ*, que es incapaz de crecer en presencia de tiamina cuando se transforma con el plásmido vacío (promotor apagado).

Del mismo modo que en apartados anteriores, nos preguntamos si alguno de los activadores y/o de los efectores de Rho1p rescataría el apagado del mutante *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ*. Entre los activadores hemos visto que *rgf1<sup>+</sup>* y *rgf2<sup>+</sup>* rescatan perfectamente el crecimiento de la cepa SC82, pero no lo hace *rgf3<sup>+</sup>* (figura 56). Entre los efectores, hemos probado sólo la sobreexpresión de *pck1<sup>+</sup>* y *pck2<sup>+</sup>* (bajo el control del promotor *nmt1*, de alto nivel de expresión). El resultado no ha sido tan claro como en el caso de los activadores. Cada uno por separado rescata parcialmente el crecimiento, pero en ningún caso la complementación es como cuando utilizamos *rho1<sup>+</sup>* o *rgf1<sup>+</sup>* (datos nos mostrados). Quizás la sobreexpresión de los dos a la vez produzca ese efecto.

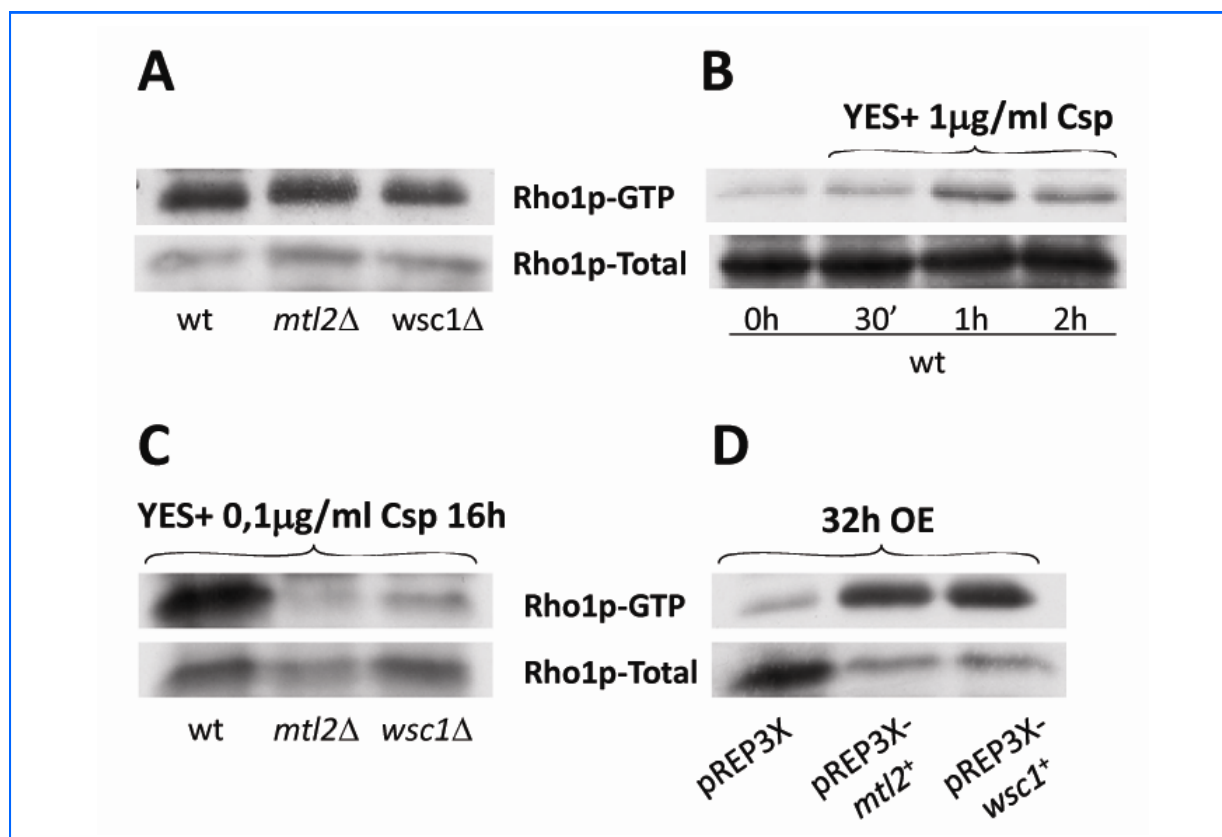
De cualquier forma, los resultados obtenidos hasta ahora sugieren un papel esencial de los “supuestos sensores” -Mtl2p y Wsc1p- en la activación de Rho1p.

### 7.8 Mtl2p y Wsc1p participan en la activación de Rho1p en células estresadas con caspofungina por largos períodos de tiempo

Puesto que la activación de Rho1p o simplemente un aumento de la cantidad de Rho1p es capaz de restablecer el crecimiento en las células con una cantidad mínima de los “sensores”, decidimos analizar “in vivo” la cantidad de Rho1p activo (Rho1p unido a GTP) en células con distintos niveles de los mismos.

La cantidad de Rho1p unida a GTP de las células se analiza mediante precipitación de Rho1-GTP con bolitas de glutation-sefarosa unidas a GST-RBD (RhoA Binding Domain), el dominio de unión a RhoA de la proteína denominada rotequina (Coll et al., 2003; Reid et al., 1996; Ren et al., 1999). Este péptido sólo se une a las proteínas Rho cuando se encuentran asociadas a GTP, de ese modo precipitando las bolas de sefarosa precipitamos también la fracción celular de Rho1p que está unida a GTP.

Para realizar estos experimentos obtuvimos extractos de proteínas a partir de cepas *mtl2Δ* (SC124) y *wsc1Δ* (SC125) que llevan la copia genómica de *rho1<sup>+</sup>* marcado con HA y expresado bajo el control de su propio promotor. La cantidad de Rho1p unido a GTP se determinó por SDS-PAGE y “Western blot” con anti-HA a partir del extracto incubado con bolitas de glutation-



**Figura 57. Regulación de la cantidad de Rho1p-GTP por Mtl2p y Wsc1p.** Extractos obtenidos a partir de: **A)** células de la cepa silvestre (SC94), *mtl2Δ* (SC124) y *wsc1Δ* (SC125) que expresan HA-*rho1*<sup>+</sup> en condiciones óptimas de crecimiento, YES a 28°C. **B)** células de la cepa silvestre (SC94) tratadas con caspofungina 1 μg/ml a diferentes tiempos (30', 1h y 2h), en YES a 28°C. **C)** células de la cepa silvestre (SC94), *mtl2Δ* (SC124) y *wsc1Δ* (SC125) sometidas a tratamiento con concentraciones subletales de caspofungina (0,1 μg/ml) durante 16 horas, en YES a 28°C. **D)** células de la cepa silvestre que expresan HA-*rho1*<sup>+</sup> transformadas con los plásmidos pREP3X (vacío), pREP3X-*mtl2*<sup>+</sup> y pREP3X-*wsc1*<sup>+</sup> después de 32 horas en medio sin tiamina; se incubaron con bolas de glutation-sefarosa conjugadas con la proteína de fusión GST-RBD a 4°C durante 2 horas y se reveló el precipitado mediante “Western blot” con el anticuerpo 12CA5 (paneles superiores). La cantidad de Rho1p en extractos totales en cada una de las cepas anteriores se determinó mediante “Western blot” revelando con el anticuerpo 12CA5 (paneles inferiores).

sefarosa que llevan unido GST-RBD. La cantidad total de Rho1p se determinó directamente por “Western blot” a partir de los extractos celulares revelando con anticuerpos anti-HA.

En la [figura 57-A](#) se puede observar que la cantidad de Rho1p total así como la cantidad de Rho1p activo (unido a GTP), es similar en las tres cepas, sugiriendo que ninguna de las dos proteínas es necesaria para mantener el nivel basal de Rho1p-GTP en condiciones óptimas de crecimiento.

Como la hipersensibilidad a caspofungina está asociada a defectos en la síntesis de β-glucano, quisimos evaluar si Mtl2p o Wsc1p podrían ser necesarias para aumentar la cantidad de Rho1p-GTP en células sometidas a condiciones de estrés por este antifúngico.

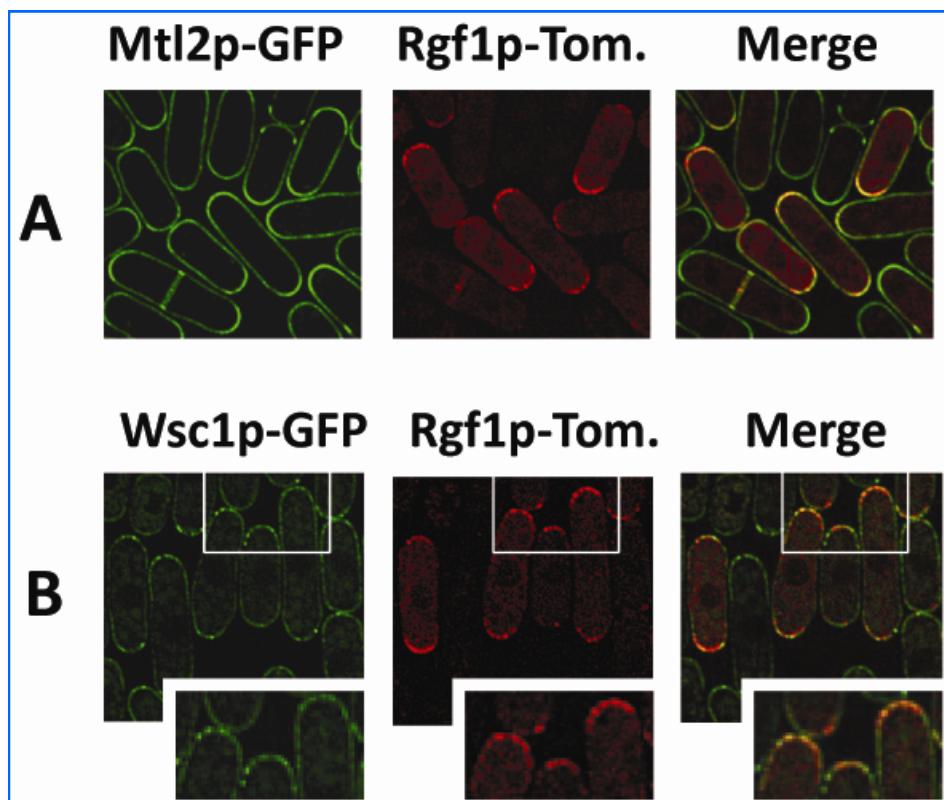
En primer lugar analizamos la cantidad de Rho1p en células tratadas con caspofungina (1 μg/ml) durante 0,5, 1 y 2 horas. En la [figura 57-B](#), se puede observar que la cantidad de Rho1p unido a GTP

aumenta con el tiempo de exposición al antifúngico. Entonces elegimos el tiempo de 1 hora en el cual la cantidad de Rho1p es mayor y analizamos si esta activación de Rho1p dependía de la presencia de alguno de los “sensores” Mtl2p y/o Wsc1p. Tampoco en este caso observamos diferencias en la cantidad de Rho1p activo en presencia de caspofungina entre la cepa silvestre y cada uno de los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* (resultados no mostrados).

También medimos la cantidad de Rho1p activo en células que habían sido tratadas con concentraciones sub-letales de caspofungina durante largos períodos de tiempo (14, 16, 18 horas). Curiosamente, en este caso si observamos diferencias. Las células de los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* contienen mucha menos cantidad de Rho1p-GTP que la cepa silvestre, cuando crecen en

un cultivo en presencia de caspofungina (0,1  $\mu\text{g/ml}$ ) durante 16 horas (**figura 57-C**).

Finalmente, quisimos ver si un aumento de la cantidad de Mtl2p y Wsc1p se podría traducir en un aumento de la cantidad de Rho1p activo. Analizamos la cantidad de Rho1p unido a GTP en células de la cepa silvestre (SC94) que sobreexpresan Mtl2p y Wsc1p a partir de los plásmidos pREP3X-*mtl2*<sup>+</sup> y pREP3X-*wsc1*<sup>+</sup> (descritos anteriormente) y utilizamos como control el plásmido pREP3X (vacío). Las células en fase logarítmica de las tres cepas se lavaron para eliminar la tiamina e inducir el promotor *nmt1* y se recogieron al cabo de 32 horas. Como se puede observar en la **figura 57-D**, la cantidad de Rho1p unido a GTP se incrementó considerablemente en las cepas que sobreexpresan Mtl2p y Wsc1p en comparación con la cepa silvestre.



**Figura 58.** Co-localización de Mtl2p-GFP y Wsc1p-GFP con Rgf1p-Tomato. Las cepas Mtl2p-GFP (SC167) y Wsc1p-GFP (GRG42) fueron transformadas con el plásmido pAL-*rgf1*<sup>+</sup>Tomato y las células se incubaron a 28°C en YES. **A:** La fluorescencia verde (Mtl2p-GFP) y roja (Rgf1p-Tomato) coinciden en los polos y el septo. **B:** La fluorescencia verde (Wsc1p-GFP) y roja (Rgf1p-Tomato) coinciden en puntos discretos en los polos, ver recuadro ampliado. (Merge: superposición de ambas fotografías, GFP y Tomato)



## 8. Relación funcional entre *Wsc1p*, *Mtl2p* y *Rgf1p*

Rgf1p y Rgf3p son GEFs de Rho1p y estimulan el intercambio de nucleótido en esta proteína durante el crecimiento vegetativo, (García et al., 2006; Tajadura et al., 2004). Rgf3p-GFP se localiza exclusivamente en la zona del septo durante la separación celular (Tajadura et al., 2004), mientras que Rgf1p-GFP se localiza en uno o ambos polos durante el crecimiento vegetativo y en el septo durante la citocinesis (García et al., 2006).

### 8.1 Estudios de co-localización entre *Mtl2p*, *Wsc1p* y *Rgf1p*

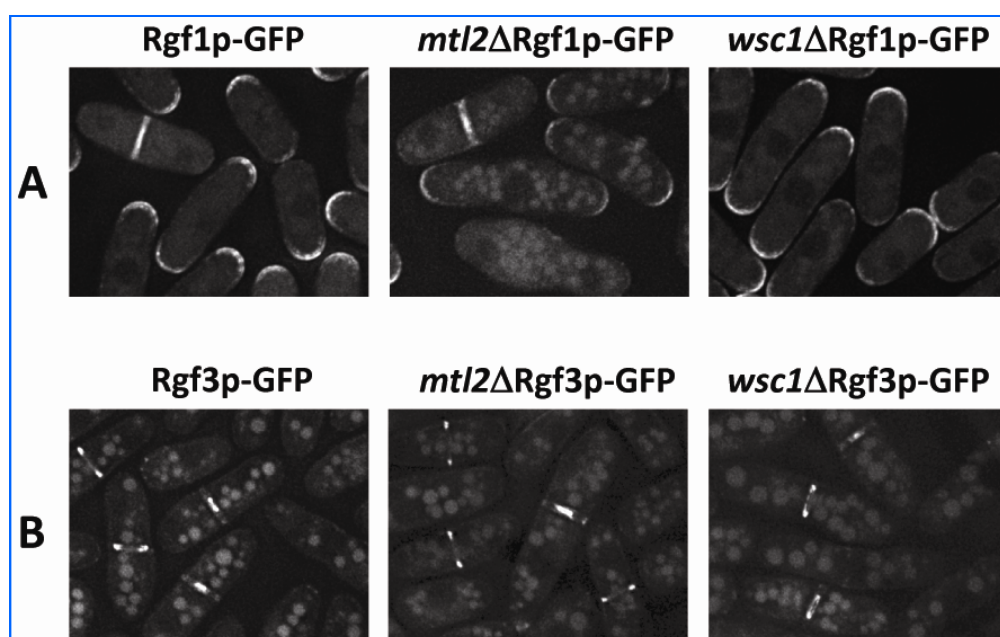
Puesto que habíamos observado que *Wsc1p*-GFP y *Mtl2p*-GFP se localizan también en los polos y en el septo además de por toda la superficie celular, realizamos estudios de co-localización de *Mtl2p*-GFP y *Wsc1p*-GFP (marcadas en verde) con la

proteína Rgf1p-Tomato (marcada en rojo). En la **figura 58**, podemos observar que ambas proteínas (*Mtl2p* y *Wsc1p*) colocalizan con Rgf1p-tomato sobre todo en los polos y en el septo. La coincidencia es mucho más patente en el caso de *Wsc1p*-GFP ya que ésta al igual que Rgf1-Tomato está polarizada y aparece en puntos discretos (ver recuadro aumentado en la **figura 58-B**).

Por ello nos propusimos investigar si *Mtl2p* o *Wsc1p* podrían participar en la activación de Rho1p por Rgf1p, Rgf3p o ambos.

### 8.2 Estudio de la localización de *Rgf1p*-GFP en los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ*

En primer lugar, examinamos la localización de Rgf1p y de Rgf3p en los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. Para ello construimos cepas *mtl2Δ rgf1Δ* (SC236) y *wsc1Δ rgf1Δ* (SC165), en las que la copia



**Figura 59.** Localización de los GEF de Rho1p (Rgf1p-GFP y Rgf3p-GFP) en los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. **A** La proteína Rgf1p-GFP integrada se visualizó en células de los mutantes *mtl2Δ* (SC236) y *wsc1Δ* (SC165). **B** La proteína Rgf3p-GFP integrada se visualizó en células de las estirpes *mtl2Δ* (SC196) y *wsc1Δ* (SC198) construidas para este experimento.

silvestre de la proteína Rgf1p está marcada con GFP e integrada en el locus *leu*. También construimos cepas *mtl2Δ rgf3Δ* (SC196) y *wsc1Δ rgf3Δ* (SC198) con Rgf3p marcada con GFP e integrada en el locus *leu*.

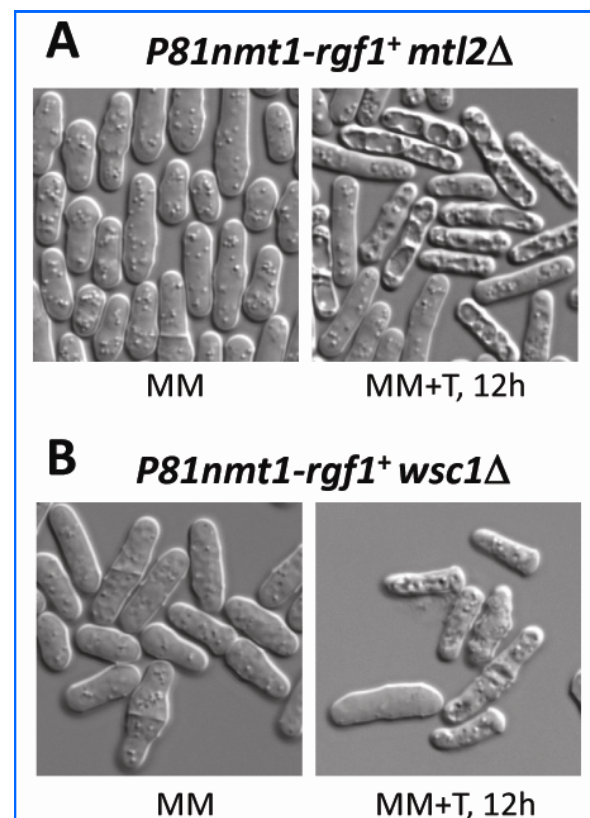
En el mutante *mtl2Δ rgf1Δ* Rgf1p-GFP (figura 59-A), muchas células muestran una fluorescencia más débil y también observamos algunas células con formas anormales, este efecto puede ser debido a la interacción genética de la mutación de *mtl2<sup>+</sup>* con una proteína Rgf1p-GFP que no sea totalmente funcional. En el mutante *wsc1Δ rgf1Δ* Rgf1p-GFP, Rgf1p se localiza normalmente en los polos y en el septo de la misma forma que lo hace en la cepa silvestre (figura 59-A). En el caso de Rgf3p-GFP, tampoco observamos diferencias entre los mutantes *mtl2Δ*, *wsc1Δ* y la cepa silvestre. En ambos casos Rgf3p se localiza en el septo formando un anillo que se contrae (figura 59-B).

### 8.3 La delección simultánea de los genes *mtl2<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* y de los genes *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* es letal

Para analizar la relación funcional entre *mtl2<sup>+</sup>*, *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>*, decidimos estudiar el fenotipo de cepas delecionadas en cada uno de los genes por parejas, sabiendo de antemano que la combinación *mtl2Δ wsc1Δ* era inviable. Así, cuando intentamos obtener las otras 2 combinaciones, *rgf1Δ mtl2Δ* y *rgf1Δ wsc1Δ*, no obtuvimos ningún mutante doble, ni analizando las esporas al azar ni mediante micromanipulación y posterior análisis de tétradas. Ambas combinaciones *rgf1Δ mtl2Δ* y *rgf1Δ wsc1Δ*

son inviables.

Estos resultados fueron confirmados al observar el fenotipo de las cepas que construimos a tal efecto y que denominamos “apagados”: *P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> mtl2Δ* (SC175) y *P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC173), que llevan la delección de *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>* respectivamente y en los que la única copia de *rgf1<sup>+</sup>* existente en la célula se encuentra bajo el control de un promotor *P81nmt1*, reprimible por tiamina. Ambas cepas crecen perfectamente en ausencia de tiamina (promotor encendido) pero son incapaces de crecer en presencia de tiamina (promotor apagado) (figura 60). La interacción sintético letal fue similar a la



**Figura 60.** Fotografías de contraste interferencial de las células *P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> mtl2Δ* (SC175) (A) y *P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> wsc1Δ* (SC173) (B), tomadas en ausencia de tiamina y después de 12 horas en presencia de 15 μg/ml de tiamina para reprimir el promotor (T: tiamina).



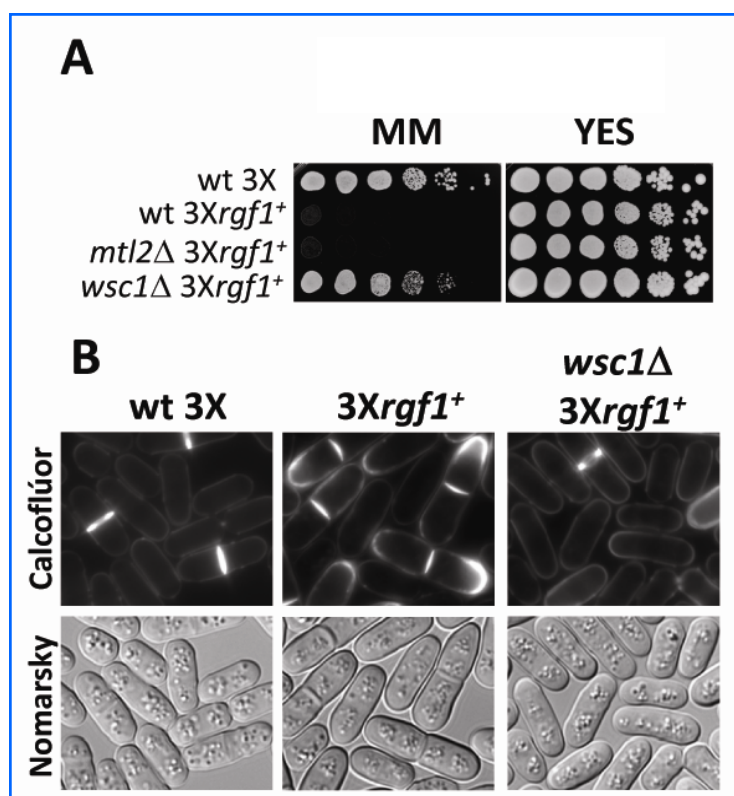
observada entre *mtl2Δ* y *wsc1Δ* (figura 38). Cuando las células creciendo en fase logarítmica (sin tiamina) se “apagan”, es decir, se añade tiamina al medio de cultivo, aproximadamente el 95% de las células se lisan con forma alargada, un fenotipo característico del mutante *rgf1Δ* y que también hemos visto en la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* (figura 38).

### 8.4 La sobreexpresión de Rgf1p no es letal en el mutante *wsc1Δ*

Los datos de los apartados anteriores indican que Mtl2p y Wsc1p podrían estar involucradas en el anclaje adecuado de Rgf1p a la membrana y/o en su activación, pero no nos aclaran si Rgf1p regula la integridad celular en paralelo o por debajo de Mtl2p y/o Wsc1p.

Para distinguir entre estas dos posibilidades, el gen *rgf1<sup>+</sup>* fue sobreexpresado en un plásmido pPGR33 (pREP3X-*rgf1<sup>+</sup>*) en la cepa silvestre y en los mutantes *mtl2Δ* (YS1220) y *wsc1Δ* (GRG15). La sobreexpresión de Rgf1p es letal en la cepa silvestre (García et al., 2006), y aumenta casi el doble la cantidad de β-glucano y de α-glucano de la pared celular (Patricia García, resultados no publicados).

Si Rgf1p estuviera regulada por Mtl2p o Wsc1p o dicho de otro modo, si la actividad de Rgf1p estuviera comprometida por la función de Mtl2p o Wsc1p, cabría esperar que las células de los mutantes *mtl2Δ* o *wsc1Δ* fueran “resistentes” a la sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>*. Por otra parte si Rgf1p y Mtl2p o Rgf1p y Wsc1p regulan la integridad celular en forma paralela, *nmt1-rgf1<sup>+</sup>* debe ser tan tóxica en células *mtl2Δ* o



**Figura 61. A-** La sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>* no es letal en el mutante *wsc1Δ*. Se inocularon diluciones seriadas de las cepas wt, *mtl2Δ* (YS1220) y *wsc1Δ* (GRG15) transformadas con el plásmido pREP3X-*rgf1<sup>+</sup>* y de la cepa wt con el plásmido pREP3X (vacío), en placas de MM sin tiamina y de YES, y se incubaron 3 días a 28°C. **B-** Se puede observar la acumulación anormal de material de pared que se tiñe con calcoflúor en la cepa silvestre pero no en el mutante *wsc1Δ*. Micrografías de contraste de Nomarsky (paneles inferiores) y de tinción con calcoflúor (paneles superiores) de la cepa silvestre (YS64) transformada con el plásmido pREP3X vacío y de la cepa silvestre (YS64) y el mutante *wsc1Δ* (GRG15) transformadas con el plásmido pREP3X-*rgf1<sup>+</sup>*.

*wsc1Δ* como lo es en las células de la cepa silvestre o podría ser aún más tóxica.

Como se muestra en la **figura 61-A** las células *wsc1Δ* son prácticamente “insensibles” a la sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>* (pREP3X-*rgf1<sup>+</sup>*), y forman colonias en condiciones de desrepresión, mientras que la cepa silvestre o el mutante *mtl2Δ* no crecen en estas condiciones. Cuando sobreexpresamos *rgf1<sup>+</sup>* en el mutante *wsc1Δ* no observamos células de gran tamaño ni acumulaciones asimétricas de material de pared celular (que se tiñen con calcoflúor), tal y como aparecen en la cepa silvestre transformada con el plásmido (pREP3X-*rgf1<sup>+</sup>*) (**Figura 61-B**). De acuerdo con esto, la morfología de las células que sobreexpresan *rgf1<sup>+</sup>* en el mutante *wsc1Δ* fue muy parecida a la de las células de la cepa silvestre transformadas con el plásmido vacío (pREP3X) (**Figura 61-B**).

Una explicación posible, aunque no la única, es que Wsc1p sea necesario para la activación de Rgf1p al menos en condiciones de estrés (como ocurre al sobreexpresar Rgf1p); en este sentido, la reducción de material de pared celular (probablemente β-glucano) podría explicar por qué el mutante *wsc1Δ* es tolerante a la sobreproducción letal de Rgf1p. Estos datos sugieren que Rgf1p actúa por debajo de Wsc1p aunque no nos dicen si lo hace directa o indirectamente.

## 9. La sobreexpresión de *wsc1* pero no de *mtl2* produce morfología aberrante y aumenta la síntesis de β-glucano

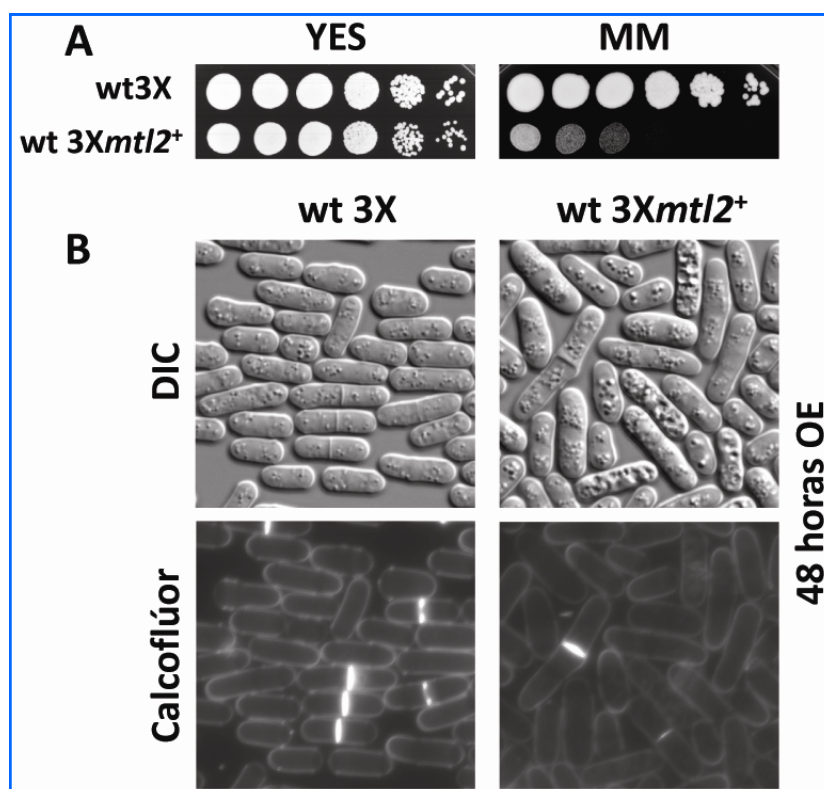
Se sabe desde hace años que los mutantes de *rho1<sup>+</sup>* constitutivamente activos (Arellano et al., 1997), o la sobreexpresión de Rgf1p producen una morfología aberrante y un aumento de la síntesis de β-glucano (García et al., 2006). Nosotros hemos demostrado que al menos en el caso de Rgf1p este fenotipo depende de Wsc1p (**figura 61-B**). Entonces razonamos que si Mtl2p o Wsc1p están involucradas en la biosíntesis de β-glucano podríamos esperar que su sobreexpresión produjera un fenotipo similar es decir un aumento del β-glucano.

### 9.1 La sobreexpresión de *mtl2<sup>+</sup>* es letal

Para estudiar el efecto de la proteína Mtl2p desregulada construimos el plásmido (pSC10) que lleva la fase de lectura abierta del gen *mtl2<sup>+</sup>* bajo el control del promotor del gen de la tiamina *nmt1<sup>+</sup>* (*no message in thiamine*) (Maundrell, 1993). (Ver Apartado 4.9 de Materiales y Métodos).

Transformamos la estirpe silvestre con el plásmido pREP3X-*mtl2<sup>+</sup>* y el plásmido control (pREP3X), seleccionamos los transformantes en placas de MM-leucina y con tiamina (15 μg/ml) y analizamos el crecimiento de ambas cepas en medio sólido con y sin tiamina mediante un ensayo de gota.

En medio con tiamina (YES) las dos cepas crecieron bien. Sin embargo, en placas de medio mínimo (MM) sin tiamina, apenas hay crecimiento de la cepa que sobreexpresa el gen *mtl2<sup>+</sup>* comparada con la cepa silvestre (**figura 62-A**).



**Figura 62.** A: La sobreexpresión de *mtl2*<sup>+</sup> es letal. Partiendo de células de la cepa silvestre transformadas con el plásmido pSC10 (pREP3X-*mtl2*<sup>+</sup>) y con el plásmido pREP3X (vacío), se realizaron diluciones seriadas y aproximadamente 3  $\mu$ l de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de MM (sin tiamina) y de YES. Las placas se incubaron 3 días a 28°C. B: Morfología de las células que sobreexpresan Mtl2p (derecha), comparadas con las células que llevan el plásmido control pREP3X (izquierda), después de 48 horas en medio sin tiamina. La morfología se observó mediante contraste interferencial (DIC) y tinción con calcoflúor (300  $\mu$ g/ml). OE-sobreexpresión.

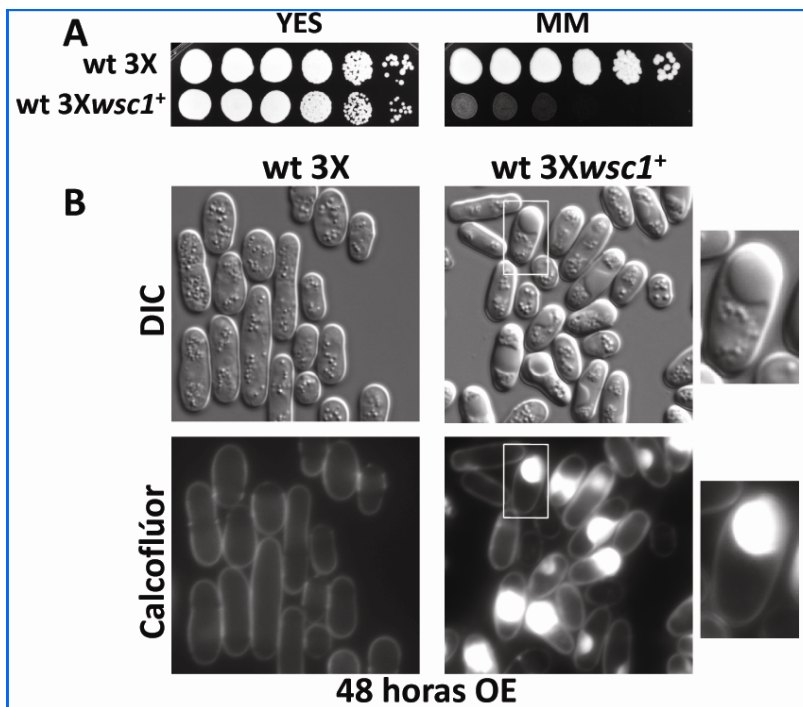
Para determinar cuál podría ser la causa de la parada en el crecimiento, examinamos la morfología de las células en medio líquido sin tiamina, por observación directa en contraste interferencial y tiñendo las células con calcoflúor. Aproximadamente después de 48 horas en medio sin tiamina vimos que en el cultivo que sobreexpresa *mtl2*<sup>+</sup> se produce un alargamiento en las células, probablemente debido a defectos de separación y también aparece aproximadamente un 17% de células lisadas (**figura 62-B**).

## 9.2 La sobreexpresión de *wscI*<sup>+</sup> es letal

De la misma forma que para *mtl2*<sup>+</sup>, construimos el plásmido pRZ16 (pREP3X-*wscI*<sup>+</sup>) que lleva la fase de lectura abierta

del gen *wscI*<sup>+</sup> bajo el control del promotor *nmt1* (ver Apartado 4.9 de Materiales y Métodos).

Cuando sobreexpresamos *wscI*<sup>+</sup> en la cepa silvestre, las células fueron incapaces de crecer en placa en ausencia de tiamina (**figura 63-A**). En medio líquido sin tiamina, las células que sobreexpresan Wsc1p son más cortas y redondeadas que las de la cepa silvestre y a veces son deformes. Cuando se realiza una tinción con calcoflúor, muchas presentan un incremento general en la fluorescencia y en algunos casos se pueden observar deposiciones aberrantes de calcoflúor (**figura 63-B**). Aunque el aumento de la fluorescencia es patente incluso antes de las 24 horas de desrepresión, las deposiciones de material fluorescente aparecen a partir de las 30 horas (**figura 63-B**).



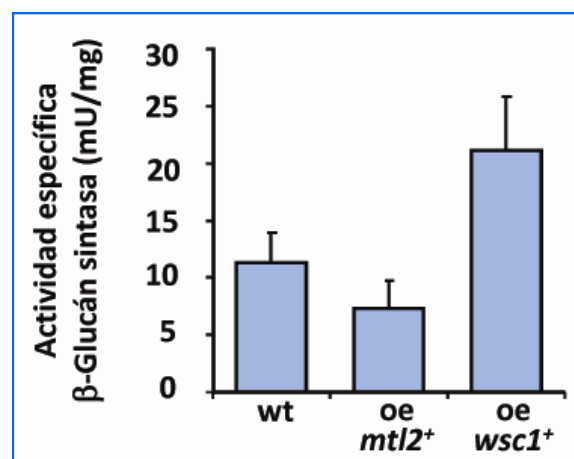
**Figura 63. A:** La sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* es letal en la cepa silvestre. Partiendo de células de la cepa silvestre transformadas con el plásmido (pREP3X-*wsc1<sup>+</sup>*) y con el plásmido pREP3X (vacío), se realizaron diluciones seriadas y aproximadamente 3  $\mu$ l de cada una de estas diluciones se sembraron en placas de MM sin tiamina y de YES. Las placas se incubaron 3 días a 28°C **B:** Morfología de las células que sobreexpresan Wsc1p. Las fotografías de contraste interferencial (paneles inferiores) y tinción con calcoflúor (300  $\mu$ g/ml) (paneles superiores) se tomaron después de 30 horas en medio sin tiamina. Las células que sobreexpresan *wsc1<sup>+</sup>* muestran deposiciones aberrantes de material que se tiñe con calcoflúor. Se ha resaltado mediante un recuadro a la derecha una de esas células, en la que se observa también en la fotografía DIC un abultamiento de la pared celular. OE-sobreexpresión.

### 9.3 La sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta la síntesis de $\alpha$ - y de $\beta$ -glucano

Analizamos la actividad  $\beta$ -glucán sintasa “in vitro” ( $\beta$ -GS) en células que sobreexpresan *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>*. Para ello transformamos la cepa silvestre con los plásmidos pREP3X (vacío), pREP3X-*mtl2<sup>+</sup>* (pSC10) y pREP3X-*wsc1<sup>+</sup>* (pRZ16) y realizamos un ensayo de actividad  $\beta$ -GS a partir de células crecidas en MM sin tiamina durante 24 horas. La actividad  $\beta$ -glucán sintasa aumentó de modo significativo (casi al doble) en la cepa que sobreexpresan *wsc1<sup>+</sup>*, con respecto a la actividad de la cepa silvestre (con el plásmido vacío). Sin embargo, la sobreexpresión de *mtl2<sup>+</sup>* disminuyó la actividad  $\beta$ -GS tal y como se muestra en la **figura 64**.

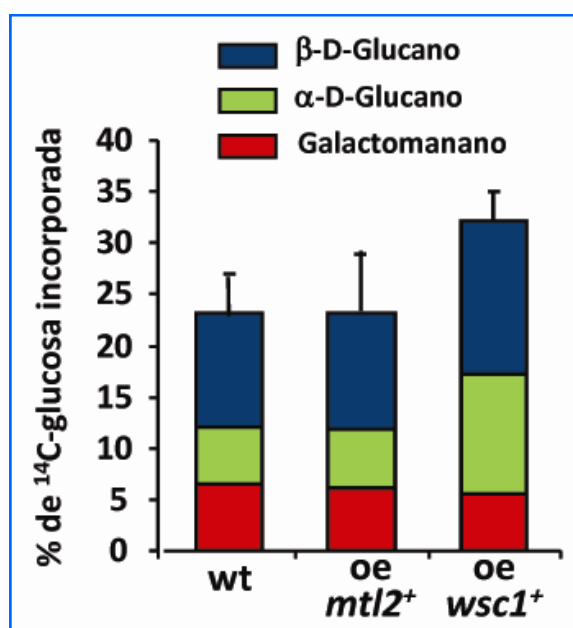
Nuestros datos indican que al aumentar la cantidad de *wsc1<sup>+</sup>* también aumenta la

actividad  $\beta$ -GS, sin embargo, no nos dicen si el material fluorescente que se acumula es  $\alpha$ -glucano,  $\beta$ -glucano o ambos. Para saberlo estudiamos la composición de los polímeros de la pared celular mediante la técnica del fraccionamiento (descrita en el Apartado 10



**Figura 64.** Actividad de la enzima  $\beta$ -(1,3) glucán sintasa en la cepa silvestre transformada con los plásmidos pREP3X, pREP3X-*mtl2<sup>+</sup>* (OP *mtl2<sup>+</sup>*) y pREP3X-*wsc1<sup>+</sup>* (OP *wsc1<sup>+</sup>*). Los valores representados son la media de la incorporación de  $^{14}$ C-glucosa de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar. OE-sobreexpresión.





**Figura 65.** Composición de la pared celular de la levadura silvestre y cepas que sobreexpresan *wsc1*<sup>+</sup> y *mtl2*<sup>+</sup>. En la gráfica se representan los niveles relativos de incorporación de <sup>14</sup>C-glucosa en cada uno de los polímeros que forman la pared celular. Incubamos las cepas en MM sin tiamina a 28°C durante 24 horas, y 12 horas antes de recoger las células añadimos <sup>14</sup>C-D-glucosa radioactiva. Los valores representados son la media de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de la incorporación total de <sup>14</sup>C-glucosa en la pared. OE -sobreexpresión.

de Materiales y Métodos).

En la **figura 65** se muestra el resultado que a su vez es la media de tres experimentos. Hay un aumento general de la pared celular en las células que sobreexpresan *wsc1*<sup>+</sup> (OP *wsc1*<sup>+</sup>), comparado con las células de la cepa silvestre y las que sobreexpresan *mtl2*<sup>+</sup> (32%, 23.5% y 23% respectivamente). Este incremento se debe tanto a un aumento de la cantidad de β-glucano (15% en la cepa que sobreexpresa *wsc1*<sup>+</sup> frente al 11% de la cepa silvestre) como a un aumento de la fracción de α-glucano (que en la cepa que sobreexpresa *wsc1*<sup>+</sup> fue el doble del de la cepa silvestre)

(**figura 65**). Sin embargo la cantidad de galactomanano es muy parecida en las tres cepas.

En resumen, existe un incremento simultáneo de los dos polímeros más importantes de la pared celular (α- y β-glucano). Este efecto es similar al observado al sobreexpresar Rgf3p (Tajadura et al., 2004) y Rgf1p (P. García, resultados no publicados) y podría deberse a un aumento desmesurado y no regulado de la actividad de Rho1p (Arellano et al., 1996). Estos resultados claramente indican que Wsc1p está involucrada en la regulación de la biosíntesis del β(1,3)-glucano y probablemente también en la de α-glucano.

## 10. Relación de *Mtl2p* y *Wsc1p* con la cascada de integridad celular liderada por *Pmk1p*

En *S. cerevisiae* la ruta de señalización más importante que controla el ensamblaje de la pared es la ruta PKC, (revisado en Lessage and Bussey, 2006; Levin, 2005). Ésta lleva un módulo “sensor” o “modulo de detección” que activa a Rho1p y que a su vez activa a Pkc1p y el modulo de MAP kinasas. La detección es llevada a cabo por proteínas de la familia Wsc (Wsc1p, Wsc2p y Wsc3p) y el par Mid2-Mtl1p y cada grupo parece responder a distintos estímulos. Por ejemplo Wsc1p es importante para sobrevivir al estrés térmico y un mutante *wsc1Δ* presenta un defecto en la activación por “heat-shock” de Mpk1p (la MAP Kinasa de la ruta) (Gray et al., 1997; Verna et al., 1997).

En *S. pombe* también existe la llamada “ruta de integridad” formada por un módulo de tres MAP Kinasas liderado por Pmk1p, que es la MAP kinasa. Sin embargo, apenas se conoce cuál es su participación en la biosíntesis de la pared celular o en otros procesos (ver Apartado 4 de la Introducción). Tampoco se conocen los “sensores” que transmiten la señal de daños en la pared u otros tipos de estrés al modulo de MAP kinasas. Entre los reguladores positivos de la cascada está Rgf1p (GEF de Rho1p), la GTPasa Rho2p y Pck2p, el ortólogo de Pkc1p en *S. cerevisiae*.

En el apartado 7 hemos visto que la sobreexpresión de *rho1*<sup>+</sup>, *rgf1*<sup>+</sup> y *pck1*<sup>+</sup> suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina de la cepa *mtl2Δ*. Curiosamente, mientras Rgf1p actúa positivamente, por encima de Pck2p, regulando una serie de estímulos hacia la ruta de integridad de Pmk1p (García et al., 2009b), Pck1p parece actuar como un regulador negativo de dicha ruta (Barba et al., 2008). Nos preguntamos si Mtl2p y/o Wsc1 también estarían implicadas en la activación de esta cascada de MAPKs. (Madrid et al., 2006).

### 10.1 Los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* no presentan el fenotipo vic (viable en presencia de inmunosupresor y de iones cloruro)

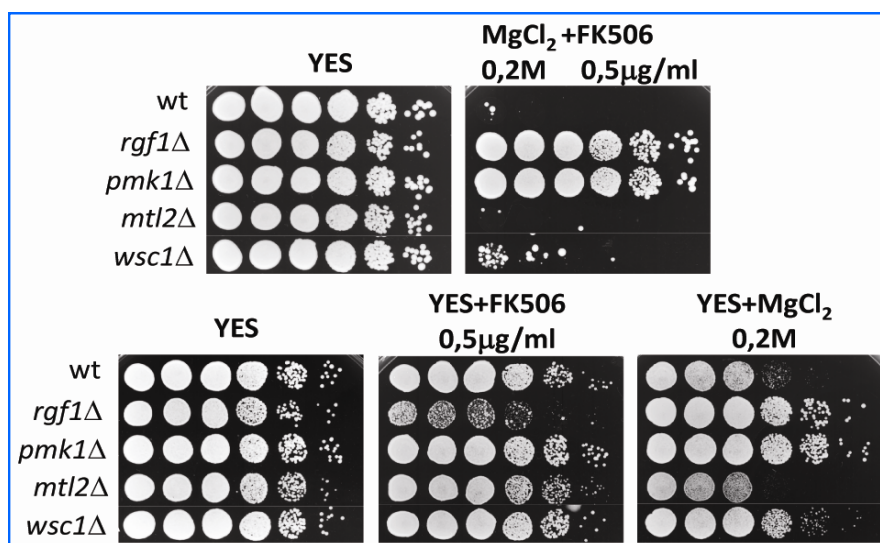
En primer lugar decidimos comprobar si las células *mtl2Δ* y *wsc1Δ* presentaban alguno de los fenotipos observados en mutantes con defectos en esta ruta. Se ha demostrado, que todos los componentes conocidos de la cascada de integridad

presentan el fenotipo *vic* (*viable in the presence of immunosuppressant and choride ion*), es decir, son viables en presencia del inmunosupresor FK506 y altas concentraciones de MgCl<sub>2</sub> (Sugiura et al., 1999; Sugiura et al., 1998). Para determinar si *mtl2Δ* y *wsc1Δ* presentaban el fenotipo *vic* realizamos un ensayo de gota con células de la cepa silvestre y de los mutantes *mtl2Δ*, *wsc1Δ*, *rgf1Δ* y *pmk1Δ*, en placas de YES suplementadas con un inhibidor específico de la calcineurina (FK506) y con MgCl<sub>2</sub> (0,2M).

En *S. pombe* los mutantes de calcineurina no crecen en presencia de MgCl<sub>2</sub>, mientras que una mutación adicional en los miembros de la ruta de MAPK suprime este fenotipo. En medio con FK506 + MgCl<sub>2</sub>, la inhibición de la calcineurina es llevada a cabo por FK506 y en consecuencia la cepa silvestre no puede crecer en presencia de iones cloro, sin embargo los mutantes que tienen delecionado alguno de los componentes de la ruta suprimen la hipersensibilidad a cloro y crecen en estas condiciones.

En la **figura 66** (paneles superiores), se puede observar que los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* se comportan como la cepa silvestre y son incapaces de crecer en estas placas, mientras que las células de los mutantes *rgf1Δ* y *pmk1Δ* (dos de los componentes de la ruta), sí crecen en este medio. En la **figura 66** parece que la cepa *wsc1Δ* crece un poco en estas condiciones por lo que podría decirse que tiene un fenotipo *vic* “ligero”. Además al sembrar las mismas cepas en placas con FK506 y MgCl<sub>2</sub> por separado (**figura 66**, paneles inferiores) observamos





**Figura 66.** Células silvestres (YS64), *rgf1*Δ (VT14), *pmk1*Δ (MS192) *mtl2*Δ (YS1220) y *wsc1*Δ (GRG15) fueron sembradas en placas de YES y de YES + FK506 (0,5 μg/ml) + MgCl<sub>2</sub> (0,2M) (paneles superiores). Se realizaron diluciones seriadas (con  $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y se sembraron aproximadamente 3μl de cada una de estas diluciones. Las mismas cepas fueron sembradas en placas de YES + FK506 (0,5 μg/ml) y YES + MgCl<sub>2</sub> (0,2M) por separado (paneles inferiores). Las placas fueron incubadas a 28°C durante 3 días.

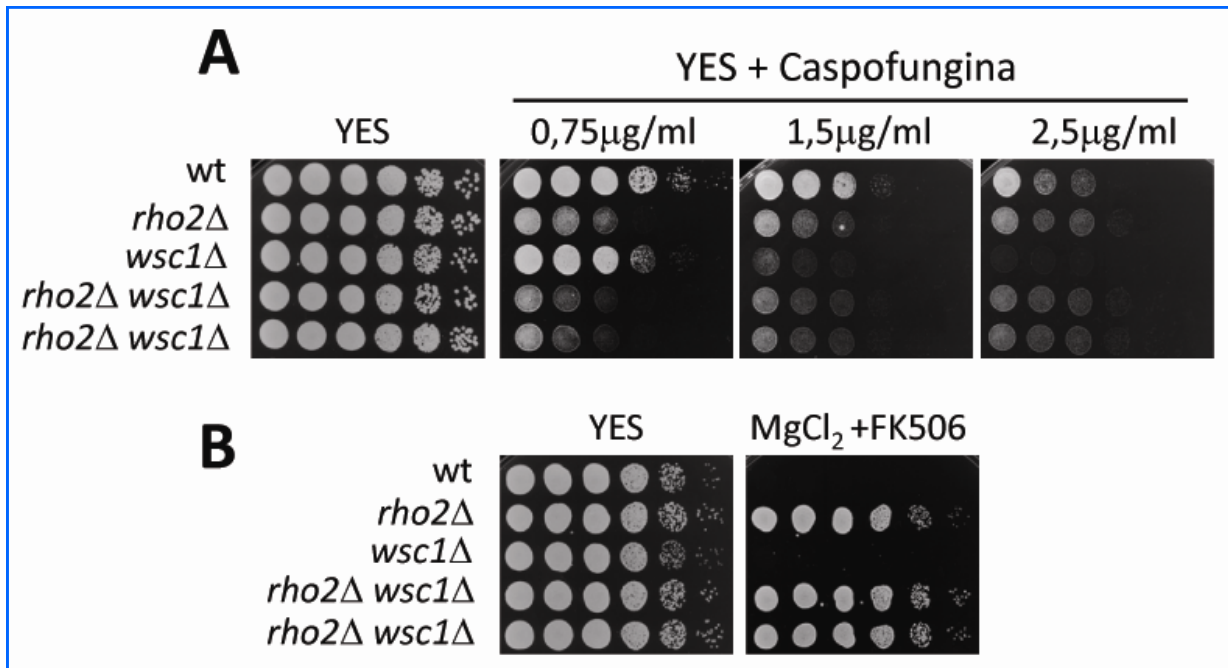
que en presencia de FK506 (0,5mg/ml) los mutantes *mtl2*Δ y *wsc1*Δ crecen de forma similar a la cepa silvestre. Mientras que en presencia de MgCl<sub>2</sub> (0,2M) el mutante *mtl2*Δ se comporta igual que la cepa silvestre pero el mutante *wsc1*Δ se parece más a los mutantes de la ruta de MAPK (*rgf1*Δ y *pmk1*Δ).

Quisimos ver si existía otro tipo de interacción genética entre los “sensores” y los componentes de la cascada. Todos los mutantes en los componentes de la cascada de MAPK de Pmk1p son sensibles a caspofungina y nosotros hemos visto que los mutantes *mtl2*Δ y *wsc1*Δ también lo son aunque en distinto grado (ver Apartado 2.2.3).

Si Wsc1p o Mtl2p actuaran como reguladores de la ruta, la sobreexpresión de los componentes de la ruta como *pck2*<sup>+</sup> o *pmk1*<sup>+</sup> podría suprimir este fenotipo de sensibilidad a caspofungina. Aunque no hemos hecho todas las combinaciones posibles, sí sabemos que ni *pck2*<sup>+</sup> ni *pmk1*<sup>+</sup> suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a

caspofungina del mutante *mtl2*Δ. No sabemos qué ocurre con el mutante *wsc1*Δ.

También obtuvimos cepas con mutaciones en los “sensores” junto con mutaciones en alguno de los componentes de la ruta, por ejemplo *wsc1*Δ *rho2*Δ y *mtl2*Δ *rho2*Δ y analizamos su crecimiento en ausencia y en presencia de caspofungina así como el fenotipo *vic*. En la **figura 67-A**, se puede observar, que la cepa *wsc1*Δ no es sensible a 0,75 μg/ml de caspofungina, mientras que el mutante *rho2*Δ sí que lo es; sin embargo al subir la concentración de caspofungina a 1,5 μg/ml, es cuando la cepa *wsc1*Δ es incluso más sensible a caspofungina que la delección de Rho2p, sugiriendo en principio que el mecanismo que provoca este defecto podría ser diferente en ambos casos (ver discusión). En cuanto a los mutantes dobles, son sensibles a las mismas concentraciones que el mutante simple *rho2*Δ, y además presentan el fenotipo *vic* como el mutante *rho2*Δ (**figura67-B**).

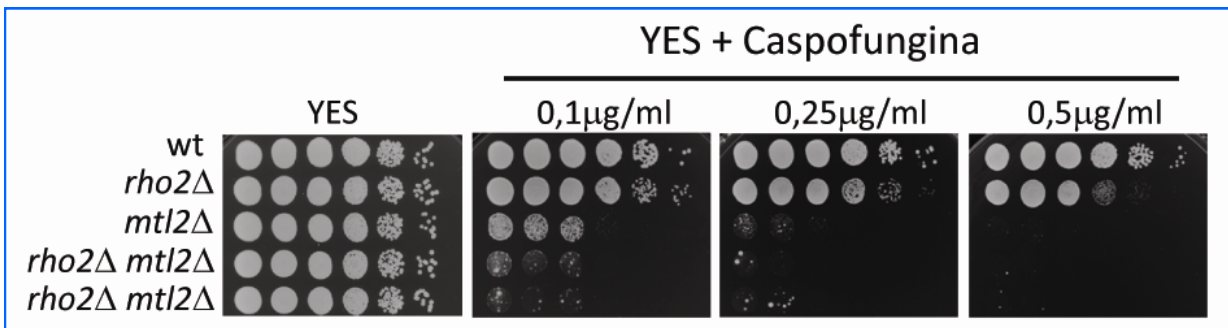


**Figura 67.** A- Ensayo de sensibilidad a caspofungina de la cepa silvestre (YS64), los mutantes *rho2Δ* (VT20), *wsc1Δ* (GRG15) y los dobles mutantes *rho2Δwsc1Δ* (SC257 y SC258). Se hicieron diluciones seriadas de cada cepa ( $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y se sembraron aproximadamente 3µl de cada dilución en placas de medio rico (YES) y YES suplementado con caspofungina (0,75µg/m, 1,5 µg/ml y 2,5µg/m). B- Las mismas cepas se sembraron en placas de YES y de YES + FK506 (0,5 µg/ml) + MgCl<sub>2</sub> (0,2M). Las placas se incubaron 3 días a 28°C.

La relación entre Mtl2p y Rho2p es diferente, los mutantes individuales *rho2Δ* y *mtl2Δ* presentan distinto grado de sensibilidad a caspofungina, siendo más sensible la cepa *mtl2Δ* que la cepa *rho2Δ*. Las cepas *mtl2Δ rho2Δ* se comportan como la cepa *mtl2Δ* con respecto al crecimiento en placas de caspofungina y son más sensibles

que la cepa *rho2Δ* (figura 68).

Estos datos y el hecho de que ambos mutantes no presenten el fenotipo *vic*, indicarían que ni Mtl2p ni Wsc1p son componentes “auténticos” de la cascada de integridad. De todos modos quisimos comprobar si Mtl2p y/o Wsc1p podrían tener



**Figura 68.** Ensayo de sensibilidad a caspofungina de la cepa silvestre (YS64), los mutantes *rho2Δ* (VT20), *mtl2Δ* (YS1220) y los dobles mutantes *rho2Δ mtl2Δ* (SC259 y SC260). Se hicieron diluciones seriadas de cada cepa ( $8 \times 10^4$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^4$ ,  $2 \times 10^3$ ,  $2 \times 10^2$  y  $2 \times 10^1$  cels/ml) y se sembraron aproximadamente 3µl de cada dilución en placas de medio rico (YES) y YES suplementado con caspofungina (0,1µg/m, 0,25 µg/ml y 0,5µg/m). Las placas se incubaron a 28°C durante tres días.

algún papel en la activación de Pmk1p.

## 10.2 La activación de Pmk1p que se produce en respuesta a estrés osmótico o a estrés por daños en la pared, no depende de Mtl2p ni de Wsc1p

Analizamos el nivel de fosforilación de Pmk1p sometida a diferentes tipos de estrés en la cepa silvestre y en los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. Se ha descrito que la activación de Pmk1p es inducida por numerosos tipos de estrés, incluyendo condiciones híper e hipotónicas, presencia de compuestos que dañan la pared celular, calor, ausencia de glucosa y estrés oxidativo (Madrid et al., 2006).

La actividad catalítica de la MAPK Pmk1p depende de la fosforilación de dos residuos, Thr-186 y Tyr-188, que puede ser detectada por “Western blot” utilizando un anticuerpo antifosfo-p42/44 (Loewith et al., 2000; Zaitsevskaya-Carter and Cooper, 1997).

En primer lugar, analizamos la fosforilación de Pmk1p en condiciones de estrés osmótico con KCl y NaCl. Para esto, utilizamos células de la cepa silvestre (MI200) y de los mutantes *mtl2Δ* (SC19) y *wsc1Δ* (SC140), todos con la copia genómica de *pmk1<sup>+</sup>* fusionada en su extremo 3' a secuencias que codifican dos epítomos HA y 6 histidinas (HA6His) (Madrid et al., 2006). Los cultivos en fase exponencial de estas tres cepas se sometieron a estrés hiper-osmótico (KCl 0,6M durante 15 minutos) y a estrés salino (NaCl 0,5M durante 30 minutos) y se tomaron alícuotas, antes y después del

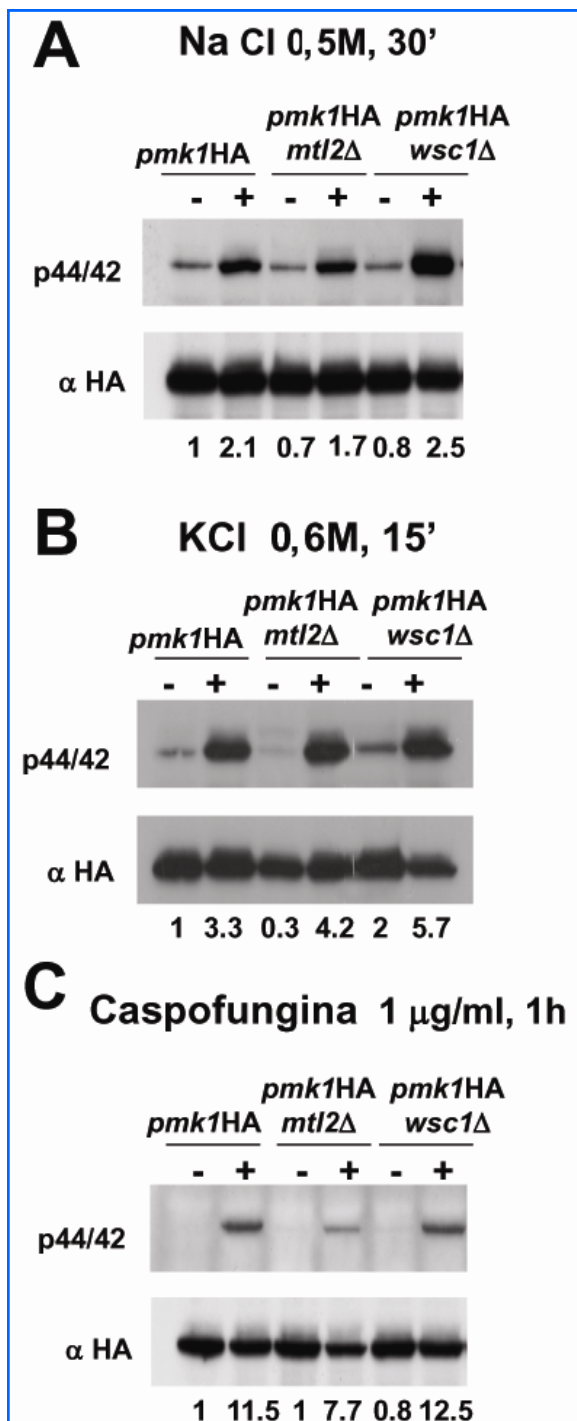
tratamiento. Las muestras se procesaron según se indica en el Apartado 11 de Materiales y Métodos.

La proteína Pmk1p se purificó mediante bolas de Ni<sup>2+</sup> que presentan afinidad por las 6His y posteriormente se analizó la fracción de Pmk1p fosforilada mediante SDS-PAGE y “Western blot”, utilizando anticuerpos policlonales antifosfo-p44/42 que detectan el estado activo de Pmk1p. Los niveles totales de Pmk1p se detectaron a partir de los extractos celulares, mediante SDS-PAGE y “Western blot” utilizando anticuerpos anti-HA (12CA5).

Como se muestra en la **figura 69 A y B**, no observamos diferencias significativas en la fosforilación de Pmk1p entre las células silvestres y los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. No se apreciaron cambios ni en la actividad basal, ni cuando las células se sometieron a estrés osmótico con KCl o NaCl.

Se hicieron además análisis cuantitativos para normalizar la intensidad de las bandas correspondientes a Pmk1p fosforilado con respecto a la cantidad total de proteína. Todos los valores independientes así obtenidos, fueron a su vez normalizados con respecto a la cantidad de proteína fosforilada que se pudo observar en la cepa silvestre sin tratar. Los resultados de estas mediciones se muestran bajo cada panel.

Algunos compuestos que producen daño en la pared celular, como ciertos antifúngicos (micafungina y caspofungina), también son capaces de activar esta cascada. Para comprobar si Mtl2p y/o Wsc1p estaban participando en la señalización de estos



**Figura 69.** Activación de Pmk1p inducida por estrés osmótico y daño en la pared celular en los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. Células de las cepas *pmk1<sup>+</sup>*-HA6His (MI200), *mtl2Δ pmk1<sup>+</sup>*-HA6His (SC19) y *wsc1Δ pmk1<sup>+</sup>*-HA6His (SC140) creciendo en fase exponencial en medio rico se trataron con NaCl 0,5M durante 30 minutos (A), KCl 0,6M 15 minutos (B) y caspofungina (1µg/ml) durante 60 minutos (C). Pmk1-HA6His se purificó por cromatografía de afinidad. La fracción de Pmk1p activada y la total se determinaron por SDS-PAGE y “Western blot”, revelando con anticuerpos antifosfo-p42/44 (panel superior) o anti-HA (panel inferior).

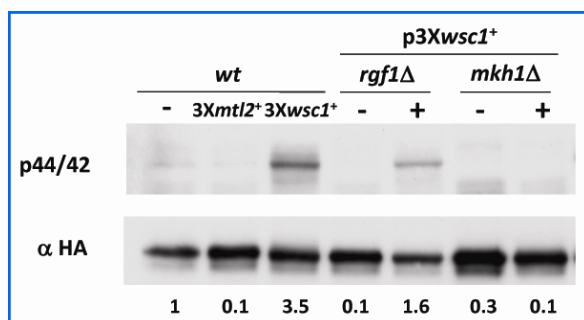
daños, tratamos las células de los mutantes *mtl2Δ*, *wsc1Δ* y de la cepa silvestre con caspofungina, 1µg/ml durante 1 hora. Como en los casos anteriores, la fosforilación de Pmk1p en los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ* es similar a la que ocurre en la cepa silvestre **figura 69-C**.

Puestos en conjunto, todos nuestros datos indican que Mtl2p y Wsc1p no desempeñan un papel importante en la señalización en respuesta a estrés osmótico y daño en la pared celular, a través de la ruta de integridad celular de Pmk1p.

Para completar el estudio también analizamos si altos niveles de Mtl2p y Wsc1p podrían dar como resultado la activación de Pmk1p en ausencia de estrés tal y como se había descrito anteriormente para Rho2p, Pck2p, Rgf1p y Rho1p (García et al., 2009b; Ma et al., 2006). Para ello transformamos la cepa Pmk1-HA6H (MI200) con los plásmidos pREP3X, pREP3X-*mtl2<sup>+</sup>* y pREP3X-*wsc1<sup>+</sup>*. Estos plásmidos sobreexpresan los genes *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>* bajo el control del promotor *nmt1* (Forsburg and Sherman, 1997). Como se aprecia en la **figura 70**, la sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta claramente los niveles de fosforilación de Pmk1p, comparado con la cepa que sobreexpresa *mtl2<sup>+</sup>* o con la portadora del plásmido vacío.

Seguidamente, nos preguntamos si la sobreexpresión de Wsc1p podría estar activando directamente a Pmk1p o necesitaría hacerlo a través del módulo de Mkh1p-Pek1p. Para averiguar esto, transformamos la cepa *mkh1Δ* (PG318) que expresa la proteína de fusión Pmk1-HA6H, con los plásmidos pREP3X y pREP3X-





**Figura 70.** La sobreexpresión de Wsc1p activa a Pmk1p y esta activación se produce a través de *mkh1*<sup>+</sup>. En la parte izquierda se muestra Pmk1p obtenida a partir de células de la cepa silvestre *pmk1*<sup>-</sup>-HA6His (MI200) transformada con los plásmidos pREP3X (vacío) y pREP3X-*wsc1*<sup>+</sup> y pREP3X-*mtl2*<sup>+</sup>, desreprimidas en MM sin tiamina durante 22 horas. En la parte derecha, las células de la cepa *mkh1*Δ *pmk1*<sup>-</sup>-HA6His (PG318) y *rgf1*Δ *pmk1*<sup>-</sup>-HA6His (PG285) fueron transformadas con los plásmidos pREP41X vacío y pREP3X-*wsc1*<sup>+</sup>. La cantidad de Pmk1p fue analizada como ya se ha descrito anteriormente, revelando con anticuerpos anti-fosfo-p42/44 (arriba) o anti-HA (abajo).

*wsc1*<sup>+</sup>. La sobreexpresión de *wsc1*<sup>+</sup> en ausencia de *mkh1*<sup>+</sup>, no produjo activación alguna de Pmk1p, como se puede observar en la **figura 70**.

Sin embargo, cuando sobreexpresamos *wsc1*<sup>+</sup> en la cepa *rgf1*Δ (PG285), sí observamos un banda de fosforilación de Pmk1p, aunque quizás no tan intensa como la que obtuvimos al sobreexpresarlo en la cepa silvestre.

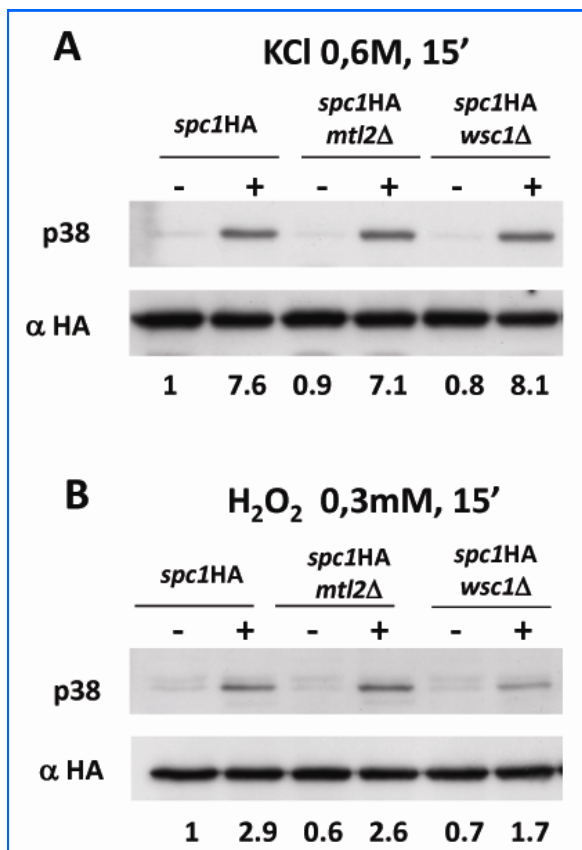
Estos datos indican que altos niveles de Wsc1p activan Pmk1p en *S. pombe*, y que lo hacen a través del módulo de MAPK, Mkh1p-Pek1p, y de manera más o menos independiente de Rgf1p, aunque para demostrar esto último habría que realizar experimentos a distintos tiempos y con distintas cantidades de proteína.

## 11. Relación de Mtl2p y Wsc1p con la cascada de respuesta a estrés

En *S. pombe*, además de la ruta de integridad celular, existe otra cascada de transducción de señales que responde a diferentes estreses, como estrés osmótico u oxidativo, y cuya MAPK es la proteína Spc1p/Sty1p (Shiozaki and Russell, 1995b). La activación de esta cascada da lugar a la relocalización en el núcleo de Spc1p y a la activación del factor de transcripción Atf1p, lo que desencadena cambios en la expresión de diferentes genes asociados con la respuesta a estrés (Takeda et al., 1995).

Nos preguntamos si Mtl2p y Wsc1p podrían estar participando en la activación de esta ruta, por lo que decidimos analizar la fosforilación de Spc1p en presencia y ausencia de Mtl2p y Wsc1p en células sometidas a diferentes tipos de estrés. Para realizar estos ensayos, se utilizaron células silvestres (SC13), *mtl2*Δ (SC30) y *wsc1*Δ (SC24), todas ellas con la copia genómica de *spc1*<sup>+</sup> marcada con HA6H, que permite la purificación de Spc1p con Ni<sup>2+</sup>-NTA y la detección de la proteína con anticuerpos anti-HA (Shiozaki and Russell, 1995b).

Como ya se había descrito con anterioridad, la exposición de las células a condiciones de alta osmolaridad, en este caso KCl 0,6M, dio lugar a un rápido incremento en la fosforilación de Spc1p (**figura 71-A**). En células *mtl2*Δ y *wsc1*Δ, este mismo tratamiento produjo un aumento similar de la señal de Spc1p, indicando que la activación de esta MAPK en respuesta a un aumento de la osmolaridad es totalmente independiente



**Figura 71.** Activación de Spc1p por estrés osmótico y estrés oxidativo en los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ*. La cepa silvestre *spc1<sup>+</sup>*-HA6His (SC13), y las cepas mutantes *mtl2Δspc1<sup>+</sup>*-HA6His (SC30) y *wsc1Δspc1<sup>+</sup>*-HA6His (SC24), fueron tratadas con KCl (0,6M) durante 15 minutos (panel A) o con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0,3mM) durante 15 minutos (panel B). En ambos casos las muestras fueron procesadas de la misma forma que en la [figura 69](#).

sometidas a diferentes tipos de estrés. Para realizar estos ensayos, se utilizaron células silvestres (SC13), *mtl2Δ* (SC30) y *wsc1Δ* (SC24), todas ellas con la copia genómica de *spc1<sup>+</sup>* marcada con HA6H, que permite la purificación de Spc1p con Ni<sup>2+</sup>-NTA y la detección de la proteína con anticuerpos anti-HA (Shiozaki and Russell, 1995b).

Como ya se había descrito con anterioridad, la exposición de las células a condiciones de alta osmolaridad, en este caso KCl 0,6M, dio lugar a un rápido incremento en la fosforilación de Spc1p ([figura 71-A](#)).

En células *mtl2Δ* y *wsc1Δ*, este mismo tratamiento produjo un aumento similar de la señal de Spc1p, indicando que la activación de esta MAPK en respuesta a un aumento de la osmolaridad es totalmente independiente de Mtl2p y Wsc1p. También examinamos la activación de Spc1p en respuesta a estrés oxidativo (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,3 mM). Como se puede ver en la [figura 71-B](#), la intensidad de la fosforilación de Spc1p después del tratamiento no se vio afectada por la delección de los genes *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>*. Podemos concluir por tanto, que ni Mtl2p y ni Wsc1p son necesarias para la activación de la cascada de MAPK de Spc1p.



# ***DISCUSIÓN***

Una función esencial de todas las células es percibir la información del medio ambiente y ajustar su fisiología en consecuencia. A menudo la percepción de la señal se lleva a cabo por “sensores” que se localizan en la superficie celular y atraviesan la membrana plasmática. Debido a la facilidad para trabajar con levaduras y a su capacidad de manipulación genética, las levaduras se han utilizado frecuentemente para estudiar estas rutas reguladoras (Lessage and Bussey, 2006; Levin, 2005; Madrid et al., 2006; Rodicio y Heinisch, 2010).

En nuestro laboratorio estamos interesados en el estudio de la pared celular en general y en particular, estudiamos la regulación del  $\beta(1,3)$ -glucano en *S. pombe*.

Entre los polisacáridos, el  $\beta(1,3)$ -glucano es el más abundante y generalmente se ha considerado un componente estructural esencial y responsable de la rigidez de la pared celular. El estudio de los reguladores de la biosíntesis de este polímero puede aportar información tanto sobre aspectos básicos relacionados con la morfogénesis y la polaridad -como el de conocer la función de las GTPasas de la familia Rho en el crecimiento polarizado- como sobre aspectos aplicados -por ejemplo, estudiar el mecanismo de acción de la caspofungina en la biosíntesis de  $\beta$ -glucano.

El objetivo de nuestro trabajo ha sido caracterizar nuevos reguladores que actúen por encima de la ruta Rho1p/Pck1p/Pck2p, que a su vez controla la síntesis de los dos principales polímeros de la pared celular y el mantenimiento de la integridad celular en *S. pombe*.

En *S. pombe* no se conocen las proteínas encargadas de detectar los daños en la pared celular y transmitir esta señal a una cascada de transducción de señales, tal y como se ha descrito para *S. cerevisiae*. Nosotros hemos identificado y caracterizado dos genes, uno nuevo al que hemos denominado *mtl2*<sup>+</sup> (*mid two like 2*) y el otro, *wsc1*<sup>+</sup>, que ya había sido identificado previamente (Willer et al., 2005), pero del que no se conocía ningún dato sobre su función.

Ambos genes codifican proteínas-Mtl2p y Wsc1p- con características estructurales de “sensores”. Las dos llevan un dominio citoplasmático en el extremo carboxilo terminal, un ectodominio periplásmico rico en serinas y treoninas y un único dominio transmembrana, que conecta el dominio citoplasmático con la larga región extracelular.

Además de estas características comunes cada una tiene sus peculiaridades. La proteína Mtl2p carece de péptido señal y tiene una cola citoplasmática muy larga, mientras que Wsc1p tiene un péptido señal, seguido por una zona rica en cisteínas denominada CRD (*cistein rich domain*) o dominio Wsc (*cell wall integrity and stress response component*) y un dominio citoplasmático muy pequeño.

El hecho de que ambas proteínas sean estructuralmente muy parecidas a los “sensores” conocidos y caracterizados en *S. cerevisiae*, no implica que Mtl2p y Wsc1p desarrollen la misma función en *S. pombe*. De hecho, la regulación de la biosíntesis de la pared en ambas levaduras es bastante diferente.

En *S. cerevisiae* la ruta de integridad o ruta PKC regula la biosíntesis de la pared celular durante los periodos de crecimiento polarizado como la gemación, la formación de la proyección sexual y la conjugación y además es necesaria para responder al estrés. Las señales se inician en la membrana plasmática a través de los “sensores” de superficie (Wsc1p, Mid2p, etc.) que junto a los GEFs estimulan el intercambio de nucleótido de Rho1p y lo activan. Rho1p activa a sus efectores que incluyen a Pkc1p y la cascada de MAP kinasas, la  $\beta$ -GS, las forminas y alguno de los componentes del exocisto (**figura 15** de la Introducción).

En *S. pombe* existe también una cascada de integridad (cascada Pmk1p), pero su papel como regulador de la biosíntesis de la pared celular está todavía sin definir. Los mutantes nulos de los componentes de la cascada son sensibles a antifúngicos (micafungina y caspofungina) y no crecen en medio con alta osmolaridad, sin embargo aún hay ciertas dudas acerca del factor o factores de transcripción activados por la MAP kinasa de la cascada y si ese hipotético factor de transcripción activa a alguno de los genes que participan en la biosíntesis de la pared celular (Takada et al., 2007).

### **1. Mtl2p y Wsc1p participan en la regulación de la integridad celular a través de Rho1p**

La conclusión más importante que se deriva de nuestro trabajo es que Mtl2p y Wsc1p son proteínas con características de sensores que participan en el mantenimiento de la integridad celular y actúan a través de Rho1p.

En primer lugar, ambos mutantes presentan células lisadas, 15% del cultivo en la cepa *mtl2* $\Delta$  y 8% en el mutante *wsc1* $\Delta$ . Además las células que carecen de *mtl2*<sup>+</sup> son muy sensibles a antifúngicos (caspofungina y calcoflúor) y a una gran variedad de estreses (cafeína, vanadato, SDS y NaCl). Las células que carecen de *wsc1*<sup>+</sup> también son sensibles a antifúngicos y a otros tipos de estrés pero en menor medida.

El mutante *mtl2* $\Delta$  presenta una disminución en la actividad  $\beta$ (1-3)-glucán sintasa y en el contenido de  $\beta$ -glucano de la pared celular, sin embargo no hemos observado ninguno de estos defectos en el mutante *wsc1* $\Delta$ . En este sentido, sería interesante valorar la actividad  $\beta$ -GS y la cantidad de glucano en el mutante *wsc1* $\Delta$ , en condiciones de estrés “agudo” (fuerte poco tiempo) o “crónico” (suave largo tiempo).

Ambos genes -*mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup>- tienen una función redundante en la viabilidad celular. La eliminación de Mtl2p o Wsc1p por separado no es letal; en cambio las cepas *mtl2* $\Delta$  *wsc1* $\Delta$  son inviables.

Esta pérdida de viabilidad está directamente relacionada con la pérdida de la integridad o lisis celular. Hemos visto que las células del mutante condicional *P8Inmt1-mtl2*<sup>+</sup> *wsc1* $\Delta$ , que carecen del gen *wsc1*<sup>+</sup> y en las que el promotor de *mtl2*<sup>+</sup> se “apaga” en presencia de tiamina, se arrugan y se lisan como células individuales y alargadas, un fenotipo muy parecido al de las células del mutante *rgf1* $\Delta$  o al de células con niveles muy bajos de Rho1p.

Si este defecto fuera debido a la falta

de activación de Rho1p, un aumento de la expresión de Rho1p o de alguno de sus activadores rescataría el fenotipo de muerte celular (lisis celular) que se produce en el mutante condicional *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* en presencia de tiamina. Efectivamente, esto es lo que ocurre, la expresión moderada (en un plásmido multicopia) de Rho1p, Rgf1p y Rgf2p rescatan el “apagado” de Mtl2p y Wsc1p.

De acuerdo con el punto anterior, cuando analizamos la cantidad de Rho1p activo (unido a GTP), en células de los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* creciendo en presencia de concentraciones subletales de caspofungina, hemos visto que la cantidad de Rho1p-GTP en los mutantes es mucho menor que la de la cepa silvestre, lo que indica que ambos, Mtl2p y Wsc1p, participan en la activación de Rho1p, al menos en estas condiciones.

En estos experimentos de “pull down” también hemos visto que en ausencia de estrés, los niveles de Rho1p activo en los mutantes son similares a los de la cepa silvestre. Incluso en presencia de un estrés fuerte, como se produce al añadir caspofungina 1μg/ml durante 1 hora, que aumenta los niveles de Rho1p activo (**figura 57**). Tampoco observamos diferencias entre los mutantes nulos y la cepa silvestre. Aunque con nuestros datos actuales este argumento es puramente especulativo, podría ocurrir que estos “sensores” sólo respondieran a un tipo de daño “crónico” y no “agudo”.

## 2. Mtl2p-GFP y Wsc1-GFP se localizan en la superficie celular

Otro de los argumentos a favor de que estas proteínas puedan actuar como “sensores” o “detectores”, es su localización. Mtl2p-GFP y Wsc1-GFP se localizan en la superficie celular, pero de manera un poco diferente.

Mtl2p-GFP se ve muy bien, la fluorescencia es intensa y se distribuye por toda la membrana plasmática. Wsc1p-GFP también se encuentra en la superficie pero aparece mucho más concentrada en “pequeños gránulos” en los polos de la célula y la señal fluorescente es menos intensa.

La intensidad de la fluorescencia en el caso de Mtl2p podría indicar que se trata de una proteína abundante. Hemos marcado la proteína Mtl2p con el epítipo HA en un plásmido multicopia, y hemos detectado una banda de tamaño (70kDa), que no aparece en la cepa control (ver Materiales y Métodos, **Apartado 7.1**). Utilizando la misma estrategia en el caso de Wsc1p, no hemos podido detectar la proteína y hemos tenido que recurrir a la sobreexpresión con el promotor *nmt1* para conseguirlo. Aunque ninguno de estos datos es definitivo, sí indican probablemente una tendencia.

Además de la abundancia, otra de las diferencias más importantes es la distribución, polarizada en el caso de Wsc1p-GFP y no polarizada (o no claramente polarizada) en el caso de Mtl2p-GFP.

Wsc1p-GFP aparece en un polo cuando la célula está creciendo de forma monopolar y en ambos polos cuando las

células han activado NETO y crecen de forma bipolar. Su localización en el polo nuevo durante NETO depende de la maquinaria de polaridad y sugiere que Wsc1p podría formar parte de complejos con otras proteínas en las zonas de crecimiento activo de la célula.

En este sentido, también hemos visto que mientras que la localización de Mtl2p-GFP no depende del citoesqueleto de actina, para que Wsc1p-GFP se localice en los polos es preciso que la actina esté correctamente polimerizada. Esto estaría de acuerdo con la existencia de un “posible” péptido señal en el caso de Wsc1p, que no aparece en la proteína Mtl2p, y con un mecanismo de transporte a la membrana plasmática diferente para estas dos proteínas.

Aunque sea bastante especulativo, podríamos decir que Mtl2p es un “sensor” abundante y más general ya que se distribuye por toda la membrana y los efectos de su eliminación son más patentes, mientras que Wsc1p es menos abundante y más específico de ciertas zonas y por eso su falta también es menos notoria. Esto también podría explicar por qué Mtl2p-GFP se localiza correctamente en el mutante *wsc1Δ*, sin embargo no ocurre lo mismo con la localización de Wsc1-GFP en el mutante *mtl2Δ*.

### 3. Wsc1p está involucrada en la regulación de la biosíntesis de $\beta(1,3)$ -glucano

Una vez que sabemos que los “sensores” se localizan en la membrana y que actúan por encima de Rho1p, nos

interesaba conocer cuál es la función específica de cada uno de ellos en cuanto a la activación de Rho1p. Para ello estudiamos la relación de estos “sensores” con los GEFs de Rho1p y con los efectores de Rho1p, y también estudiamos el efecto producido al desregularlos aumentando mucho su cantidad.

Los datos más claros, los hemos obtenido para Wsc1p y se resumen a continuación:

La sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* es letal, las células son más cortas y redondeadas que las de la cepa silvestre y a veces son deformes. Cuando se realiza una tinción con calcoflúor, muchas presentan un incremento general en la fluorescencia y en algunos casos se pueden observar deposiciones aberrantes de calcoflúor. Curiosamente, la sobreexpresión de Wsc1p bajo el control del promotor  *$\delta$ Inmt1* (de baja expresión), también es letal, lo que sugiere que la síntesis de Wsc1p debe estar fuertemente regulada tanto espacial como temporalmente.

Para saber qué contienen esos “acúmulos de material que se tiñe con calcoflúor”, analizamos la composición de los polímeros de la pared celular en las células que sobreexpresan Wsc1p. Observamos un fuerte incremento en la biosíntesis de la pared en general y un aumento simultáneo de los dos polímeros más importantes el  $\alpha$ - y el  $\beta$ -glucano.

Este fenotipo podría ser consecuencia de una activación de Rho1p o del aumento de alguno de sus activadores, y ya había sido descrito anteriormente cuando se sobreexpresa un mutante hiperactivo de

Rho1p y cuando se sobreexpresan Pck2p y Rgf1p (Arellano et al., 1996; Arellano et al., 1999b y resultados de nuestro laboratorio no publicados).

Decidimos pues estudiar la posible interacción entre Wsc1p y los GEFs de Rho1p, Rgf1p y Rgf3p.

No observamos ningún tipo de cambio en la localización de Rgf3p en los mutantes *wsc1Δ*.

En el caso de Rgf1p, sí observamos que Wsc1p-GFP co-localiza con Rgf1p-Tomato, sobre todo en los polos donde ambas proteínas aparecen en puntos discretos (**figura 58**). Sin embargo la localización de Rgf1p no depende de la presencia o ausencia de Wsc1p y no sabemos qué ocurriría al contrario, es decir, cómo se localiza Wsc1p-GFP en un mutante *rgf1Δ*.

La delección simultánea de los genes *wsc1<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* es letal y las células del mutante condicional *P81nmt1-rgf1<sup>+</sup> wsc1Δ* se lisan con forma alargada, un fenotipo característico del mutante *rgf1Δ* (30% de lisis) y que también hemos visto en la cepa *P81nmt1-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ*.

Descartada la posibilidad de que Wsc1p sea importante en el anclaje de Rgf1p, la interacción sintético-letal no excluye la posibilidad de que Wsc1p participe en la activación de Rgf1p, pero no aclara si Rgf1p regula la integridad celular en paralelo o por debajo de Wsc1p.

Si Rgf1p estuviera regulada de algún modo por Wsc1p, cabría esperar que las células de los mutantes *wsc1Δ* fueran

“resistentes” a la sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>*. Por otra parte, si Rgf1p y Wsc1p regulan la integridad celular en forma paralela, la sobreexpresión de Rgf1p debería ser tan tóxica en células *wsc1Δ* como lo es en las células de la cepa silvestre.

El resultado es que las células *wsc1Δ* son prácticamente “insensibles” o “tolerantes” a la sobreexpresión de *rgf1<sup>+</sup>*, indicando que Rgf1p actúa por debajo de Wsc1p, aunque no nos dice si directa o indirectamente.

Aunque no se ha recogido en la memoria, también hicimos el experimento a la inversa, es decir, sobreexpresamos Wsc1p en un mutante *rgf1Δ*. En este caso vimos que en un ensayo de gota en placa, las células que sobreexpresan Wsc1p en un mutante *rgf1Δ*, crecen en la primera dilución pero no en las 4 siguientes, mientras que las que sobreexpresan Wsc1p en la cepa silvestre no llegan ni a crecer en la primer dilución. En líquido y en presencia de calcoflúor, las “deposiciones de material fluorescente” son menores en la cepa *rgf1Δ* que en la silvestre, pero el efecto es muy diferente a lo que ocurre cuando se sobreexpresa Rgf1p en el mutante *wsc1Δ*, indicando que la sobreexpresión de Wsc1p podría estar afectando a otras dianas. Por ejemplo, sabemos que la sobreexpresión de Rho2p, que es letal en la cepa silvestre, no lo es en los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* (datos no mostrados en la memoria).



#### 4. Mtl2p actúa en paralelo con respecto a Wsc1p regulando la integridad celular.

Es difícil de interpretar y llegar a alguna conclusión sobre la función de Mtl2p con respecto a Rho1p, a Rgf1p y a la ruta de integridad.

Como ya hemos comentado antes, las células *mtl2Δ* son muy sensibles a una gran variedad de estreses. Además, la ausencia de Mtl2p causa una serie de defectos relacionados con la estructura y composición de la pared celular como son una disminución de la actividad GS y del contenido de β-glucano y una mayor sensibilidad a antifúngicos (caspofungina y calcoflúor).

El fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2Δ* se suprime casi totalmente aumentando el número de copias de Wsc1p (“posible sensor” si nuestro trabajo así lo demuestra), de Rgf1p y Rgf2p (GEFs de Rho1p), de Rho1p y de Pck1p (efector de Rho1p), lo que definiría una posible ruta de “salvamento” cuando se producen daños en la pared celular.

Este resultado sugiere un papel de Mtl2p regulando la integridad en paralelo con Wsc1p y una hipotética cascada formada por Wsc1p-Rgf1p/Rgf2p-Rho1p-Pck1p.

En este sentido, sabemos que un aumento de la expresión de Mtl2p, pero no de Wsc1p, es capaz de rescatar el crecimiento de la cepa *rgf1Δ* pero a bajas concentraciones de caspofungina (0,07 y 0,1 μg/ml). Mtl2p podría estar actuando en

paralelo con Rgf1p, mientras que en el caso de Wsc1p el resultado apunta a un papel en la misma vía de transducción de señales posiblemente por encima de Rgf1p.

La delección simultánea de los genes *mtl2<sup>+</sup>* y *rgf1<sup>+</sup>* es letal, igual que la delección de los dos “sensores” *mtl2<sup>+</sup>* y *wsc1<sup>+</sup>* y el fenotipo del “apagado” de las cepas correspondientes es casi idéntico.

Si Rgf1p y Mtl2p regularan la integridad celular en forma paralela, *nmt1-rgf1<sup>+</sup>* debería ser tan tóxica en células *mtl2Δ*, como lo es en las células de la cepa silvestre y esto es lo que ocurre. Quizás sea prematuro y especulativo, pero parecería que la activación de Rgf1p no depende de Mtl2p, sin embargo el defecto de las células *mtl2Δ* es paliado por un aumento de Rgf1p, lo que indicaría de nuevo que actúan en vías paralelas.

Por último la localización de Rgf1p es menos intensa en ausencia de Mtl2p y por ello un aumento de los niveles de Rgf1p podría compensar el defecto en la integridad del mutante *mtl2Δ*.

#### 5. Mtl2p y Wsc1p no participan en la señalización en respuesta a estrés osmótico y daño en la pared celular a través de la ruta Pmk1p.

Esta parte ya ha sido discutida en el apartado correspondiente de los resultados, sin embargo hay algún dato que no aparece en la memoria y que podría aclarar la discusión.

En resumen, aunque en *S. cerevisiae* la cascada lleva el módulo de “sensores” o módulo de detección que activa a Rho1p y éste a su vez activa a *PKC1* y el módulo de MAP kinasas, en *S. pombe*, el escenario parece un poco diferente.

En nuestro grupo hemos visto que Rgf1p (GEF de Rho1p) es necesaria para la fosforilación de la MAPK Pmk1p en respuesta a estrés osmótico y a estrés producido por daños en la pared y que actúa por encima de Rho2p y de Pck2p (García et al., 2009 y resultados no publicados). También sabemos que la sobreexpresión del alelo constitutivamente activo de Rho1p activa la cascada, igual que la sobreexpresión de cualquiera de sus GEFs (Rgf1p, Rgf2p o Rgf3p), aunque ni Rgf2p ni Rgf3p forman parte de la cascada (García et al., 2009).

Por otra parte, el papel de Rho1 como activador de la  $\beta$ -GS parece que es independiente de su papel como activador de la cascada. Las células que sobreexpresan Rgf1p o Rho1pG15V (constitutivamente activo), presentan un fenotipo letal, con deposiciones de material que se tiñe con calcoflúor y gran cantidad de pared. Esta letalidad se mantiene en la cepa que carece de Pmk1p (la MAPK de la cascada). Además los niveles de la actividad  $\beta$ -GS en el mutante *pmk1* $\Delta$  son similares a los de la cepa silvestre (resultados no publicados).

Los “sensores” Mtl2p y Wsc1p activan o señalizan hacia Rho1p y nuestros datos indican que ni Mtl2p ni Wsc1p son componentes “auténticos” de la cascada, aunque tampoco se ha demostrado claramente que Rho1p lo sea.

Los mutantes *mtl2* $\Delta$  y *wsc1* $\Delta$  no presentan el fenotipo *vic* (viable en presencia de inmunosupresor y de iones cloruro), característico de los mutantes en los componentes de la cascada.

Si Wsc1p o Mtl2p actuaran como reguladores de la ruta, la sobreexpresión de los componentes de la ruta como *pck2*<sup>+</sup> o *pmk1*<sup>+</sup> podría suprimir el fenotipo de sensibilidad a caspofungina de estos mutantes. Sin embargo, ni *pck2*<sup>+</sup> ni *pmk1*<sup>+</sup> suprimen el fenotipo de hipersensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2* $\Delta$  y no hemos realizado los experimentos para saber que ocurre con el mutante *wsc1* $\Delta$ .

También hemos visto que los mutantes dobles entre uno de los “sensores” junto con mutaciones en alguno de los componentes de la ruta, crecen normalmente, lo que también podría significar que no colaboran en ninguna función esencial en relación con la integridad celular o que colaboran en la misma función no esencial.

Curiosamente, su comportamiento en presencia de caspofungina es diferente. Las células *wsc1* $\Delta$  *rho2* $\Delta$  son sensibles a las mismas concentraciones que el mutante simple *rho2* $\Delta$ , y además presentan el fenotipo *vic* como el mutante *rho2* $\Delta$ . Las cepas *mtl2* $\Delta$  *rho2* $\Delta$ , se comportan como la cepa *mtl2* $\Delta$  respecto al crecimiento en placas de caspofungina y son bastante más sensibles que la cepa *rho2* $\Delta$ . No sabemos qué ocurre con respecto al fenotipo *vic*. En este sentido, parece que la sensibilidad a caspofungina del mutante *mtl2* $\Delta$  se produce por mecanismos diferentes a la de *rho2* $\Delta$ , haciendo todavía más improbable que ambos formen parte de

la misma ruta.

Pero quizás el dato más concluyente de los mencionados hasta ahora es que la activación de Pmk1p que se produce en respuesta a estrés osmótico o a estrés producido por daños en la pared, no depende de Mtl2p ni de Wsc1p. No observamos diferencias significativas en la fosforilación de Pmk1p entre las células silvestres y los mutantes nulos *mtl2Δ* y *wsc1Δ*, ni cuando las células se someten a estrés osmótico (con KCl o NaCl), ni en presencia de caspofungina.

Tampoco observamos diferencias entre los mutantes *mtl2Δ* y *wsc1Δ* y la cepa silvestre, analizado otros tipos de estrés, como estrés oxidativo, “heat-shock” o ayuno de glucosa.

Sin embargo, sí hemos visto que la sobreexpresión de *wsc1<sup>+</sup>* aumenta claramente los niveles de fosforilación de Pmk1p, comparado con la cepa que sobreexpresa *mtl2<sup>+</sup>* o con la cepa que lleva el plásmido vacío. Este aumento depende del módulo de MAP kinasas ya que no se produce en el mutante *mhk1Δ* y depende sólo parcialmente de Rgf1p. La sobreexpresión de Wsc1p aumenta los niveles de Rho1p activo y también aumenta la cantidad de pared celular, lo que es un estrés para la célula y podría actuar activando la cascada indirectamente.

Aun así y puesto que los “sensores” comparten una función esencial en lo que respecta a la integridad celular, podríamos pensar que sólo la ausencia de los dos a la vez debería tener un efecto en la transmisión de la señal.

Por eso realizamos un experimento para ver los niveles de fosforilación de Pmk1p en la cepa del “apagado” *P81nmtl-mtl2<sup>+</sup> wsc1Δ* en presencia de tiamina. Después de 4 horas en condiciones de represión y 1 hora más en presencia de caspofungina (1μg/ml), observamos un aumento de fosforilación de Pmk1p similar al observado en la misma cepa en ausencia de tiamina (promotor desreprimido). Estos datos indican de nuevo que la eliminación de ambos “sensores” no parece tener un efecto importante en la fosforilación de Pmk1p.

# *CONCLUSIONES*

## CONCLUSIONES

1. Las proteínas Mtl2p y Wsc1p de *S. pombe* presentan características estructurales similares a los “sensores” de *S. cerevisiae* Wsc1p y Mid2p. Un único dominio transmembrana, que conecta las proteínas con la larga región extracelular, un dominio citoplasmático en el extremo carboxilo terminal, y un ectodominio periplásmico rico en serinas y treoninas.

2. Mtl2p y Wsc1p se localizan en la superficie celular pero de manera diferente. Mtl2p se distribuye por toda la periferia de la célula y en el septo. Wsc1p se localiza de forma polarizada y aparece más concentrada en “pequeños gránulos” en los polos de la célula.

3. Mtl2p y Wsc1p participan en la regulación de la integridad celular donde desarrollan una función esencial. La delección simultánea de *mtl2*<sup>+</sup> y *wsc1*<sup>+</sup> es letal.

4. Mtl2p y Wsc1p participan en la activación de Rho1p y los dos interaccionan genéticamente con Rgf1p (un GEF de Rho1p).

5. Wsc1p está involucrada en la regulación de la biosíntesis de  $\beta(1,3)$ -glucano y probablemente también en la de  $\alpha(1,3)$ -glucano. Las células que sobreexpresan Wsc1p presentan un incremento general en la cantidad total de pared celular y deposiciones aberrantes de calcoflúor. Además, Wsc1p es necesario para la activación de Rgf1p al menos en condiciones de estrés.

6. Mtl2p y Wsc1p no desempeñan un papel importante en la señalización en respuesta a estrés osmótico y daño en la pared celular a través de la ruta de integridad celular de Pmk1p.

# ***BIBLIOGRAFÍA***



- Adamo, J.E., Rossi, G., and Brennwald, P.** (1999). The Rho GTPase Rho3 has a direct role in exocytosis that is distinct from its role in actin polarity. *Mol Biol Cell* *10*, 4121-4133.
- Alfa, C., Fantes, P., Hyams, J., McLeod, M., and Warbrick, E.** (1993). Experiments with fission yeast: a laboratory course manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.).
- Alonso-Nuñez, M.L., An, J., Martín-Cuadrado, A.B., Mehta, S., Petit, C., Sipiczki, M., del Rey, F., Gould, K.L., and Vázquez de Aldana, C.R.** (2005). Ace2p controls the expression of genes required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* *16*, 2003-2017.
- Alvarez-Tabarés, I., Grallert, A., Ortiz, J.M., and Hagan, I.M.** (2007). *Schizosaccharomyces pombe* protein phosphatase 1 in mitosis, endocytosis and a partnership with Wsh3/Tea4 to control polarised growth. *J Cell Sci* *120*, 3589-3601.
- Amoah-Buahin, E., Bone, N., and Armstrong, J.** (2005). Hyphal Growth in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* *Jul;4(7)*, 1287-1297.
- Arellano, M., Cartagena-Lirola, H., Nasser Hajibagheri, M.A., Duran A., and Valdivieso, M.H.** (2000). Proper ascospore maturation requires the *chsI*<sup>+</sup> chitin synthase gene in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* *35*, 79-89.
- Arellano, M., Coll, P.M., Yang, W., Durán, A., Tamanoi, F., and Pérez, P.** (1998). Characterization of the geranylgeranyl transferase type I from *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* *29*, 1357-1367.
- Arellano, M., Durán, A., and Pérez, P.** (1997). Localization of the *Schizosaccharomyces pombe* Rho1 GTPase and its involvement in the organization of the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* *110*, 2547-2555.
- Arellano, M., Durán, A., and Pérez, P.** (1996). Rho1 GTPase activates the (1-3) $\beta$ -D-glucan synthase and is involved in *Schizosaccharomyces pombe* morphogenesis. *EMBO J* *15*, 4584-4591.
- Arellano, M., Valdivieso, M.H., Calonge, T.M., Coll, P.M., Durán, A., and Pérez, P.** (1999b). *Schizosaccharomyces pombe* protein kinase C homologues, Pck1p and Pck2p, are targets of Rho1p and Rho2p and differentially regulate cell integrity. *J Cell Sci* *112*, 3569-3578.
- Armstrong, J., Bone, N., Dodgson, J., and Beck, T.** (2007). The role and aims of the FYSSION project. *Brief Funct Genomic Proteomic* *6*, 3-7.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K.** (1995). *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley and Sons, New York.
- Bähler, J., Wu, J.-Q., Longtine, M.S., Shah, N.G., McKenzie III, A., Steever, A.B., Wach, A., Philippsen, P., and Pringle, J.R.** (1998). Heterologous

modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943-951.

**Barba, G., Soto, T., Madrid, M., Núñez, A., Vicente, J., Gacto, M., and Cansado, J.** (2008). Activation of the cell integrity pathway is channelled through diverse signalling elements in fission yeast. *Cell Signal* 20, 748-757.

**Basi, G., Schmid, E., and Maundrell, K.** (1993). TATA box mutations in the *Schizosaccharomyces pombe nmt1* promoter affect transcription efficiently but not the transcription start point or thiamine represibility. *Gene* 123, 131-136.

**Bathe, M., and Chang, F.** (2009). Cytokinesis and the contractile ring in fission yeast: towards a system-level understanding. *Trends in Microbiology* 18, 38-45.

**Berro, J., Sirotkin, V., and Pollard, T.D.** (2010). Mathematical Modeling of Endocytic Actin Patch Kinetics in Fission Yeast: Disassembly Requires Release of Actin Filament Fragments. *Mol Biol Cell Epub ahead of print*.

**Bobbit, T.F., Nordin, J.H., Roux, M., Revol, J.F., and R.H., M.** (1977). Distribution and conformation of crystalline nigeran in hyphal walls of *Aspergillus niger* and *A. awamori*. *J Bacteriol* 132, 691-703.

**Bone, N., Millar, J.B.A., Toda, T., and Armstrong, J.** (1998). Regulated vacuole fusion and fision in *Schizosaccharomyces pombe*: an osmotic response dependent on MAP kinases. *Curr Biol* 8, 135-144.

**Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

**Brunner, D., and Nurse, P.** (2000). CLIP170-like tip1p spatially organizes microtubular dynamics in fission yeast. *Cell* 102, 695-704.

**Bush, D.A., Horisberger, M., Horman, I., and Wursch, P.** (1974). The wall structure of *S. pombe*. *J Gen Microbiol* 81, 199-206.

**Cabib, E., Bowers, B., Sburlati, A., and Silverman, S.J.** (1988). Fungal cell wall synthesis: the construction of a biological structure. *Microb Rev* 5, 370-375.

**Calonge, T., M., Nakano, K., Arellano, M., Arai, R., Katayama, S., Toda, T., Mabuchi, I., and Perez, P.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Rho2 GTPase regulates the cell wall a-glucan biosynthesis, through the protein kinase Pck2. *Mol Biol Cell* 11, 4393-4401.

**Calonge, T.M., Arellano, M., Coll, P.M., and Perez, P.** (2003). Rga5p is a specific Rho1p GTPase-activating protein that regulates cell integrity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Microbiol* 47, 507-518.

**Carnero, E., Ribas, J.C., Garcia, B., Duran, A., and Sanchez, Y.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe* Ehs1p is involved in maintaining cell wall integrity and in calcium uptake. *Mol Gen Genet* 264, 173-183.

- Castro, C., Ribas, J.C., Valdivieso, M.H., Varona, R., del Rey, F., and Durán, A.** (1995). Papulacandin B resistance in budding and fission yeasts: isolation and characterization of a gene involved in (1,3)-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* *177*, 5732-5739.
- Coll, P.M., Trillo, Y., Ametzazurra, A., and Perez, P.** (2003). Gef1p, a new guanine nucleotide exchange factor for Cdc42p, regulates polarity in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* *14*, 313-323.
- Cortes, J.C., Carnero, E., Ishiguro, J., Sanchez, Y., Duran, A., and Ribas, J.C.** (2005). The novel (1,3) $\beta$ -D-glucan synthase catalytic subunit Bgs4p from fission yeast is essential during both cytokinesis and polarized growth. *J Cell Sci* *118*, 157-174.
- Cortes, J.C., Ishiguro, J., Duran, A., and Ribas, J.C.** (2002). Localization of the (1,3) $\beta$ -D-glucan synthase catalytic subunit homologue Bgs1p/Cps1p from fission yeast suggests that it is involved in septation, polarized growth, mating, spore wall formation and spore germination. *J Cell Sci* *115*, 4081-4096.
- Cortés, J.C., Konomi, M., Martins, I.M., Muñoz, J., Moreno, M.B., Osumi, M., Durán, A., and Ribas, J.C.** (2007). The (1,3) $\beta$ -D-glucan synthase subunit Bgs1p is responsible for the fission yeast primary septum formation. *Mol Microbiol* *65*, 201-217.
- Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G., Ward, W.W., and Prasher, D.C.** (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science* *263*, 802-805.
- Chang, F., and Martin, S.G.** (2009). Shaping fission yeast with microtubules. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *1*, a001347.
- Chang, F., and Verde, F.** (2004). Control of cell polarity and morphogenesis in fission yeast. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe* Genetics, genomics and beyond, R. Egel, ed. (Springer), pp. 255-268.
- Chappell, T.G., Hajibagheri, M.A., Ayscough, K., Pierce, M., and Warren, G.** (1994). Localization of an alpha 1,2 galactosyltransferase activity to the Golgi apparatus of *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* *5*, 519-528.
- Chappell, T.G., and Warren, G.** (1989). A galactosyl transferase for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Biol* *109*, 2693-2702.
- Chen, D., Toone, W.M., Mata, J., Lyne, R., Burns, G., Kivinen, K., Brazma, A., Jones, N., and J., B.** (2003). Global transcriptional responses of fission yeast to environmental stress. *Mol Biol Cell* *14*, 214-229.
- Das, M., Wiley, D.J., Chen, X., Shah, K., and Verde, F.** (2009). The conserved NDR kinase Orb6 controls polarized cell growth by spatial regulation of the small GTPase Cdc42. *Curr Biol* *19*, 1314-1319.
- De Groot, P.W., Hellingwerf, K.J., and Klis, F.M.** (2003). Genome-wide identification of fungal GPI proteins. *Yeast* *20*, 781-796.

- De Groot, P.W., Yin, Q.Y., Weig. M., Sosinska, G.J., Klis, F.M., and de Koster, C.G.** (2007). Mass spectrometric identification of covalently bound cell wall proteins from the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 24, 267-278.
- Dekker, N., de Haan, A., and Hochstenbach, F.** (2006). Transcription regulation of the alpha-glucanase gene *agn1* by cell separation transcription factor *Ace2p* in fission yeast. *FEBS Lett* 580, 3099-3106.
- Dekker, N., Speijer, D., Grun, C.H., van den Berg, M., de Haan, A., and Hochstenbach, F.** (2004). Role of the alpha-glucanase *Agn1p* in fission-yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 15, 3903-3914.
- Dekker, N., van Rijssel, J., Distel, B., and Hochstenbach, F.** (2007). Role of the alpha-glucanase *Agn2p* in ascus-wall endolysis following sporulation in fission yeast. *Yeast* 24, 279-288.
- Deresinski, S.C., and Stevens, D.A.** (2003). Caspofungin. *Clin Infect Dis* 36, 1445-1457.
- Díaz, M., Sanchez, Y., Bennett, T., Sun, C.R., Godoy, C., Tamanoi, F., Duran, A., and Perez, P.** (1993). The *Schizosaccharomyces pombe* *cwg2<sup>+</sup>* gene codes for the  $\beta$  subunit of a geranylgeranyltransferase type I required for  $\beta$ -glucan synthesis. *EMBO J* 12, 5245-5254.
- Doering, T.L.** (2009). How sweet it is! Cell wall biogenesis and polysaccharide capsule formation in *Cryptococcus neoformans*. *Annu Rev Microbiol* 63, 223-247.
- Douglas, C.M.** (2001). Fungal  $\beta(1,3)$ -D-glucan synthesis. *Medical Micology* 39 (Suplement), 55-66.
- Douglas, C.M., Foor, F., Marrinan, J.A., Morin, N., Nielsen, J.B., Dahl, A.M., Mazur, P., Baginsky, W., Li, W., El-Sherbeini, M., et al.** (1994). The *Saccharomyces cerevisiae* *FKS1 (ETG1)* gene encodes an integral membrane protein which is a subunit of 1,3- $\beta$ -D-glucan synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 12907-12911.
- Drummond, D.R., and Cross, R.A.** (2000). Dynamics of interphase microtubules in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Biol* 10, 766-775.
- Dupres, V., Alsteens, D., Wilk, S., Hansen, B., Heinisch, J.J., and Dufrêne, Y.F.** (2009). The yeast *Wsc1* cell surface sensor behaves like a nanospring in vivo. *Nat Chem Biol* 5, 857-862. .
- Duran, A., and Pérez, P.** (2004). Cell wall synthesis. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe* Genetics, genomics and beyond, R. Egel, ed. (Springer), pp. 269-276.
- Egel, R.** (1994). Regulation of meiosis and sporulation in *Schizosaccharomyces pombe*. In *The Mycota I*, Wessels-Meinhardt, ed. (Berlin. Heidelberg, Springer-Verlag), pp. 251-265.
- Egel, R., and Egel-Mitani, M.** (1974). Premeiotic DNA synthesis in fission yeast. *Exp Cell Res* 88, 127-134.

- Encinar del Dedo, J., Dueñas, E., Arnáiz, Y., del Rey, F., and Vázquez de Aldana, C.R.** (2009).  $\beta$ -glucanase Eng2 is required for ascus wall endolysis after sporulation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryot Cell* 8, 1278-1286.
- Feierbach, B., and Chang, F.** (2001). Roles of the fission yeast formin For3 in cell polarity, actin cable formation and symmetric cell division. *Curr Biol* 11, 1656-1665.
- Fischer, R., Zekert, N., and Takeshita, N.** (2008). Polarized growth in fungi--interplay between the cytoskeleton, positional markers and membrane domains. *Mol Microbiol* 68, 813-826.
- Forsburg, S.L.** (1993). Comparison of *Schizosaccharomyces pombe* expression systems. *Nucleic Acids Res* 21, 2955-2956.
- Forsburg, S.L., and Sherman, D.A.** (1997). General purpose tagging vectors for fission yeast. *Gene* 191, 191-195.
- Gachet, Y., Mulvihill, D.P., and Hyams, J.S.** (2004). The fission yeast actomyosin cytoskeleton. In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe* Genetics, genomics and beyond, R. Egel, ed. (Springer), pp. 225-242.
- Garcia, I., Jimenez, D., Martín, V., Duran, A., and Sanchez, Y.** (2005). The  $\alpha$ -glucanase Agn1p is required for cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *Biol Cell* 97, 569-576.
- Garcia, I., Martín, V., Tajadura, V., Toda, T., and Sánchez, Y.** (2006). Synthesis of  $\alpha$ -glucans in fission yeast spores is carried out by three alpha-glucan synthase paralogs, Mok12p, Mok13p and Mok14p. *Mol Microbiol* 59, 836-853.
- García, P., García, I., Marcos, F., Ruiz de Garibay, G., and Sánchez, Y.** (2009a). Fission yeast Rgf2p is a Rho1p guanine nucleotide exchange factor required for spore wall maturation and for the maintenance of cell integrity in the absence of Rgf1p. *Genetics* 181, 1321-1334.
- García, P., Tajadura, V., García, I., and Sánchez, Y.** (2006a). Rgf1p is a specific Rho1-GEF that coordinates cell polarization with cell wall biogenesis in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 1620-1631.
- García, P., Tajadura, V., García, I., and Sánchez, Y.** (2006b). Role of Rho GTPases and Rho-GEFs in the regulation of cell shape and integrity in fission yeast. *Yeast* 23, 1031-1043.
- García, P., Tajadura, V., and Sánchez, Y.** (2009b). The Rho1p exchange factor Rgf1p signals upstream from the Pmk1 mitogen-activated protein kinase pathway in fission yeast. *Mol Biol Cell* 20, 721-731.
- Gemmill, T.R., and Trimble, R.B.** (2004). Protein Glycosylation. . In *The molecular biology of Schizosaccharomyces pombe* Genetics, genomics and beyond, R. Egel, ed. (Springer), pp. 405-414.
- Glynn, J.M., Lustig, R.J., Berlin, A., and Chang, F.** (2001). Role of bud6p and tea1p in the interaction between actin and

microtubules for the establishment of cell polarity. *Curr Biol* 11, 836-845.

**Golub, E.I.** (1988). "One-minute" transformation of competent *E. coli* by plasmid DNA. *Nucl Acids Res* 16, 1641.

**Gotoh, Y., Nishida, E., Shimanuki, M., Toda, T., Imai, Y., and Yamamoto, M.** (1993). *Schizosaccharomyces pombe* Spk1 is a tyrosine-phosphorylated protein functionally related to *Xenopus* mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 13, 6427-6434.

**Gray, J.V., Ogas, J.P., Kamada, Y., Stone, M., Levin, D.E., and Herskowitz, I.** (1997). A role for the Pkc1 MAP Kinase pathway of *Saccharomyces cerevisiae* in bud emergence and identification of a putative upstream regulator. *EMBO J* 16, 4924-4937.

**Green, N., Alexander, H., Olson, A., Alexander, S., Shinnick, T.M., Sutcliffe, J.G., and Lerner, R.A.** (1982). Immunogenic structure of the influenza virus hemagglutinin. *Cell* 28, 477-487.

**Green, R., Lesage, G., Sdicu, A.M., Ménard, P., and Bussey, H.** (2003). A synthetic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* stress sensor Mid2p, and identification of a Mid2p-interacting protein, Zeo1p, that modulates the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *Microbiology* 149, 2487-2499.

**Hagan, I.M.** (1998). The fission yeast microtubule cytoskeleton. *J Cell Sci* 111 (*Pt 12*), 1603-1612.

**Hayles, J.A., and Nurse, P.** (2001). A

journey into space. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2, 647-656.

**Heckman, D.S., Geiser, D.M., Eidell, B.R., Stauffer, R.L., Kardos, N.L., and Hedges, S.B.** (2001). Molecular evidence for the early colonization of land by fungi and plants. *Science* 293, 1129-1133.

**Heinisch, J.J., Dupres, V., Alsteens, D., and Dufrêne, Y.F.** (2010a). Measurement of the mechanical behavior of yeast membrane sensors using single-molecule atomic force microscopy. *Nat Protoc* 5, 670-677.

**Heinisch, J.J., Dupres, V., Wilk, S., Jendretzki, A., and Dufrêne, Y.F.** (2010b). Single-molecule atomic force microscopy reveals clustering of the yeast plasma-membrane sensor Wsc1. *PLoS One* 5, e11104.

**Hirata, D., Nakano, K., Fukui, M., Takenaka, H., Miyakawa, T., and Mabuchi, I.** (1998). Genes that cause aberrant cell morphology by overexpression in fission yeast: a role for a small GTP-binding protein Rho2 in cell morphogenesis. *J Cell Sci* 111, 149-159.

**Hirota, K., Tanaka, K., Ohta, K., and Yamamoto, M.** (2003). Gef1p and Scd1p, the two GDP-GTP exchange factors for Cdc42p, form a ring structure that shrinks during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 14, 3617-3627.

**Hochstenbach, F., Klis, F.M., Van den Ende, H., Van Donselaar, E., Peters, P.J., and Klausner, R.D.** (1998). Identification of a putative alpha-glucan



synthase essential for cell wall construction and morphogenesis in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 95, 9161-9166.

**Horisberger, M., and Rouvet-Vauthey, M.** (1985). Cell wall architecture of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Experientia* 41, 748-749.

**Horisberger, M., Vonlanthen, M., and Rosset, J.** (1978). Localization of  $\alpha$ -galactomannan and of wheat germ agglutinin receptors in *Schizosaccharomyces pombe*. *Arch Microbiol* 119, 107-111.

**Hoyer, L.L.** (2001). The ALS gene family of *Candida albicans*. *Trends in Microbiol* 9, 176-180.

**Humbel, B.M., Konomi, M., Takagi, T., Kamasawa, N., Ishijima, S.A., and Osumi, M.** (2001). In situ localization of  $\beta$ -glucans in the cell wall of *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 18, 433-444.

**Hutzler, F., Gerstl, R., Lommel, M., and Strahl, S.** (2008). Protein N-glycosylation determines functionality of the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall integrity sensor Mid2p. *Mol Microbiol* 68, 1438-1449.

**Ishiguro, J., and Kobayashi, W.** (1996). An actin point-mutation neighboring the 'hydrophobic plug' causes defects in the maintenance of cell polarity and septum organization in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 392, 237-241.

**Ishiguro, J., Saitou, A., Duran, A.,**

**and Ribas, J.C.** (1997). *cps1<sup>+</sup>*, a *Schizosaccharomyces pombe* gene homolog of *Saccharomyces cerevisiae* *FKS* genes whose mutation confers hypersensitivity to cyclosporin A and papulacandin B. *J Bacteriol* 179, 7653-7662.

**Iwaki, N., Karatsu, K., and Miyamoto, M.** (2003). Role of guanine nucleotide exchange factors for Rho family GTPases in the regulation of cell morphology and actin cytoskeleton in fission yeast. *Biochem Biophys Res Commun* 312, 414-420.

**Jaffe, A.B., and Hall, A.** (2005). Rho GTPases: Biochemistry and Biology. *Ann Rev Cell Dev Biol* 21, 247-269.

**Kamada, Y., Quadota, H., Python, C.P., Anraku, Y., Ohya, Y., and Levin, D.** (1996). Activation of yeast protein kinase C by Rho1 GTPase. *J Biol Chem* 271, 9193-9196.

**Kamasaki, T., Arai, R., Osumi, M., and Mabuchi, I.** (2005). Directionality of F-actin cables changes during fission yeast cell cycle. *Nat Cell Biol* 7, 916-917.

**Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P., and Toda, T.** (1999a). Fission yeast  $\alpha$ -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol* 144, 1173-1186.

**Katayama, S., Hirata, D., Arellano, M., Pérez, P., and Toda, T.** (1999b). Fission yeast  $\alpha$ -glucan synthase Mok1 requires the actin cytoskeleton to localize the

sites of growth and plays an essential role in cell morphogenesis downstream of protein kinase C function. *J Cell Biol* 144, 1173-1186.

**Keating, G.M., and Jarvis, B.** (2001). Caspofungin. *Drugs* 61, 1121-1129.

**Keeney, J.B., and Boeke, J.D.** (1994). Efficient targeted integration at *leu1-32* and *ura4-294* in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 136, 849-856.

**Ketela, T., Green, R., and Bussey, H.** (1999). *Saccharomyces cerevisiae* mid2p is a potential cell wall stress sensor and upstream activator of the PKC1-MPK1 cell integrity pathway. *J Bacteriol* 181, 3330-3340.

**Kim, H., Yang, P., Catanuto, P., Verde, F., Lai, H., Du, H., Chang, F., Marcus, S.** (2003). The kelch repeat protein, Tea1, is a potential substrate target of the p21-activated kinase, Shk1, in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 278, 30074-30082.

**Konomi, M., Fujimoto, K., Toda, T., and M., Osumi.** (2003). Characterization and behaviour of  $\alpha$ -glucan synthase in *Schizosaccharomyces pombe* as revealed by electron microscopy. *Yeast* 20, 427-438.

**Kunkel, T.A.** (1985). Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 488-492.

**Kushner, R.S.** (1978). An improved method for transformation of *Escherichia coli* with ColE1 derived plasmids. Boyer, HW and Nicosia, S (ed) *Genetic Engineering*

Elsevier, Amsterdam, 17-24.

**Kushnirov, V.V.** (2000). Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* Jun 30;16(9), 857-860.

**Laemmli, U.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

**Latgé, J.P.** (2007). The cell wall: a carbohydrate armour for the fungal cell. *Mol Microbiol* 66, 279-290.

**Le Goff, X., Woollard, A., and Simanis, V.** (1999). Analysis of the *cps1* gene provides evidence for a septation checkpoint in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Gen Genet* 262, 163-172.

**Lesson, G., and Bussey, H.** (2006). Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 317-343.

**Leupold, U.** (1950). Die Vererbung von Homothallie und Heterothallie bei *Schizosaccharomyces pombe*. *C R Lab Carlsberg, Sér Physiol* 24, 381-480.

**Levin, D.** (2005). Cell wall integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 69, 262-291.

**Liu, J., Wang, H., MacCollum, D., and Balasubramanian, M.K.** (1999). Drc1p/Cps1p, a 1,3-beta-glucan synthase subunit, is essential for division septum assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* 153, 1193-1203.

**Liu, J., Tang, X., Wang, H., and Balasubramanian, M.K.** (2000a). Bgs2p, a 1,3- $\beta$ -glucan synthase subunit is essential for maturation of ascospore wall in *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett* 478, 105-108.

**Liu, J., Wang, H., and Balasubramanian, M.K.** (2000b). A checkpoint that monitors cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113, 1223-1230.

**Liu, J., Tang, X., Wang, H., Olfierenko, S., and Balasubramanian, M.K.** (2002). The localization of the integral membrane protein Cps1p to the cell division site is dependent on the actomyosin ring and the septation-inducing network in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 13, 989-1000.

**Lodder, A.L., Lee, T.K., and Ballester, R.** (1999). Characterization of the Wsc1 protein, a putative receptor in the stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152, 1487-1499.

**Loewith, R., Hubberstey, A., and Young, D.** (2000). Skh1, the MEK component of the Mkh1 signaling pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 113, 153-160.

**Loo, T.H., and Balasubramanian, M.** (2008). *Schizosaccharomyces pombe* Pak-related protein, Pak1p/Orb2p, phosphorylates myosin regulatory light chain to inhibit cytokinesis. *J Cell Biol* Dec 1;183(5), 785-793.

**Ma, Y., Kuno, T., Kita, A., Asayama,**

**Y., and Sugiura, R.** (2006). Rho2 is a target of the farnesyltransferase Cpp1 and acts upstream of Pmk1 mitogen-activated protein kinase signaling in fission yeast. *Mol Biol Cell* 17, 5028-5037.

**Madrid, M., Soto, T., Khong, H.K., Franco, A., Vicente, J., Pérez, P., Gacto, M., and Cansado, J.** (2006). Stress-induced response, localization, and regulation of the Pmk1 cell integrity pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 281, 2033-2043.

**Manners, D.J., and Meyer, M.T.** (1977). The molecular structures of some glucans from the cell wall of *S. pombe*. *Carbohydr Res* 57, 189-203.

**Marcus, S., Polverino, A., Chang, E., Robbins, D., Cobb, M.H., and Wigler, M.** (1995). Shk1, a homolog of the *Saccharomyces cerevisiae* Ste20 and mammalian p65PAK protein kinases, is a component of a Ras/Cdc42 signaling module in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 6180-6184.

**Marks, J., and Hyams, J.S.** (1985). Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur J Cell Biol* 39, 27-32.

**Martin-Cuadrado, A.B., Dueñas, E., Sipiczki, M., Vazquez de Aldana, C.R., and del Rey, F.** (2003). The endo-beta-1,3-glucanase Eng1p is required for dissolution of the primary septum during cell separation in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* 116, 1689-1698.

**Martin-Cuadrado, A.B., Morrell, J.L., Konomi, M., An H., Petit, C., Osumi, M., Balasubramanian, M., Gould, K.L., Del Rey, F., and Vazquez de Aldana, C.R.** (2005). Role of septins and the exocyst complex in the function of hydrolytic enzymes responsible for fission yeast cell separation. *Mol Biol Cell* 10, 4867-4881.

**Martín-Cuadrado, A.B., Fontaine, T., Esteban, P.F., del Dedo, J.E., de Medina-Redondo, M., del Rey, F., Latgé, J.P., and de Aldana, C.R.** (2008a). Characterization of the endo-beta-1,3-glucanase activity of *S. cerevisiae* Eng2 and other members of the GH81 family. *Fungal Genet Biol* 45, 542-553.

**Martín-Cuadrado, A.B., Encinar del Dedo, J., de Medina-Redondo, M., Fontaine, T., del Rey, F., Latgé, J.P., and Vázquez de Aldana, C.R.** (2008b). The *Schizosaccharomyces pombe* endo-1,3-beta-glucanase Eng1 contains a novel carbohydrate binding module required for septum localization. *Mol Microbiol* 69, 188-200.

**Martin, H., Rodríguez-Pachon, J.M., Ruiz, C., Nombela, C., and Molina, M.** (2000a). Regulatory mechanisms for modulation of signalling through the cell integrity. *J Biol Chem* 275, 1511-1519.

**Martin, S.G.** (2009). Microtubule-dependent cell morphogenesis in the fission yeast. *Trends in Cell Biology* 19, 447-454.

**Martin, S.G., and Chang, F.** (2006). Dynamics of the formin for3p in actin cable assembly. *Curr Biol* 16, 1161-1170.

**Martin, S.G., McDonald, W.H., Yates III, J., and Chang, F.** (2005). Tea4p links microtubule plus ends with the formin For3p in the establishment of cell polarity. *Develop Cell* 8, 479-491.

**Martin, S.G., Rincón, S.A., Basu, R., Pérez, P., and Chang, F.** (2007). Regulation of the formin for3p by cdc42p and bud6p. *Mol Biol Cell* 18, 4155-4167.

**Martin, V., García, B., Carnero, E., Durán, A., and Sanchez, Y.** (2003). Bgs3p, a putative 1,3- $\beta$ -glucan synthase subunit, is required for cell wall assembly in *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 2, 159-169.

**Martin, V., Ribas, J.C., Carnero, E., Durán, A., and Sánchez, Y.** (2000b). Bgs2p, a sporulation-specific glucan synthase homologue is required for proper ascospore wall maturation in fission yeast. *Mol Microbiol* 38, 308-321.

**Mata, J., and Nurse, P.** (1997). Tea1 and the microtubular cytoskeleton are important for generating global spatial order within the fission yeast. *Cell* 89, 939-950.

**Matsuo, Y., Asakawa, K., Toda, T., and Katayama, S.** (2006). A rapid method for protein extraction from fission yeast. *Biosci Biotechnol Biochem Aug;70(8)*, 1992-1994.

**Maundrell, K.** (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127-130.

**Mazur, P., Morin, N., Baginsky, W., El-Sherbeini, M., Clemas, J.A., Nielsen,**

**J.B., and Foor, F.** (1995). Differential expression and function of two homologous subunits of yeast 1,3-beta-D-glucan synthase. *Mol Cell Biol* *15*, 5671-5681.

**McCollum, D., Feoktiskova, A., Morphew, M., Balasubramanian, M.K., and Gould, K.L.** (1996). The *Schizosaccharomyces pombe* actin-related protein, Arp3, is a component of the cortical actin cytoskeleton and interacts with profilin. *EMBO J* *15*, 6438-6446.

**Medina-Redondo, M., Arnaiz-Pita, Y., Fontaine, T., Latgé, J.P., and Vázquez de Aldana, C.R.** (2008). The  $\beta$ -1,3-glucanosyltransferase gas4p is essential for ascospore wall maturation and spore viability in *Schizosaccharomyces pombe* *Mol Microbiol* *68*, 1283-1299.

**Merla, A., and Johnson, D.I.** (2000). The Cdc42p GTPase is targeted to the site of cell division in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Int J Cell Biol* *79*, 469-477.

**Merla, A., and Johnson, D.I.** (2001). The *Schizosaccharomyces pombe* Cdc42p GTPase signals through Pak2p and the Mkh1p-Pek1p-Spm1p MAP kinase pathway. *Curr Genet* *39*, 205-209.

**Miller, P.J., and I., J.D.** (1994). Cdc42p GTPase is involved in controlling polarized growth in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* *14*, 1075-1083.

**Mitchison, J.M., and Nurse, P.** (1985). Growth in cell length in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Cell Sci* *75*, 357-376.

**Moreno, S., Klar, A., and Nurse, P.** (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Meth Enzymol* *194*, 795-823.

**Morrell-Falvey, J.L., Ren, L., Feoktistova, A., Haese, G.D., and Gould, K.L.** (2005). Cell wall remodeling at the fission yeast cell division site requires the Rho-GEF Rgf3p. *J Cell Sci* *118*, 5563-5573.

**Moseley, J.B., and Goode, B.L.** (2006). The yeast actin cytoskeleton: from cellular function to biochemical mechanism. *Microbiol Mol Biol Rev* *70*, 605-645.

**Motegi, F., Arai, R., and Mabuchi, I.** (2001). Identification of two type V Myosins in fission yeast, one of which functions in polarized cell growth and moves rapidly in the cell. *Mol Biol Cell* *12*, 1367-1380.

**Mulvihill, D.P., Edward, S.R., and Hyams, J.S.** (2006). A critical role for the type V myosin, Myo52, in septum deposition and cell fission during cytokinesis in *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Motil Cytoskeleton* *63*, 149-161.

**Murray, J.M., and Johnson, D.I.** (2001). The Cdc42p GTPase and Its Regulators Nrf1p and Scd1p Are Involved in Endocytic Trafficking in the Fission Yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* *276*, 3004-3009.

**Mutoh, T., Nakano, K., and Mabuchi, I.** (2005). Rho1-GEFs Rgf1 and Rgf2 re involved in formation of cell wall and septum, while Rgf3 is involved in cytokinesis in fission yeast. *Genes Cells* *10*, 1189-1202.

**Nakano, K., Arai, R., and Mabuchi, I.** (1997). The small GTP binding protein Rho1 is a multifunctional protein that regulates actin localization, cell polarity, and septum formation in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 2, 679-694.

**Nakano, K., Mutoh, T., and Mabuchi, I.** (2001). Characterization of GTPase-activating proteins for the function of the Rho-family small GTPases in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Genes Cells* 6, 1031-1042.

**Nakano, K., mai, J., Arai, R., Toh-E, A., Matsui, Y., et al, and Mabuchi, I.** (2002). The small GTPase Rho3 and the diaphanous/formin For3 function in polarized cell growth in fission yeast. *J Cell Sci* 115, 4629-4639.

**Nakano, K., Mutoh, T., Arai, R., and Mabuchi, I.** (2003). The small GTPase Rho4 is involved in controlling cell morphology and septation in fission yeast. *Genes to Cells* 8, 357-370.

**Nakano, K., Arai, R., and Mabuchi, I.** (2005). Small GTPase Rho5 is a functional homologue of Rho1, which controls cell shape and septation in fission yeast. *FEBS Lett* 579, 5181-5186.

**Nicholas, R.O., Williams, D.W., and Hunter, P.A.** (1994). Investigation of the value of  $\beta$ -glucan-specific fluorochromes for predicting the  $\beta$ -glucans content of the cell wall of zoopathogenic fungi. *Mycol Res* 98, 694-698.

**Nolen, B.J., and Pollard, T.D.** (2008).

Structure and biochemical properties of fission yeast Arp2/3 complex lacking the Arp2 subunit. *J Biol Chem* 283, 26490-26498.

**Nonaka, H., Tanaka, K., Hirano, H., Fujiwara, T., Kohno, H., Umikawa, M., Mino, A., and Takai, Y.** (1995). A downstream target of *RHO1* small GTP-binding protein is *PKCI*, a homolog of protein kinase C, which leads to activation of the MAP kinase cascade in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14, 5931-5938.

**Nurse, P.** (1994). Fission yeast morphogenesis. *Mol Biol Cell* 5, 613-616.

**Odds, F.C., Brown, A. J. and Gow, N. A.** (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 11, 272-279.

**Ohashi, T., and Takegawa, K.** (2010). N- and O-linked oligosaccharides completely lack galactose residues in the *gms1och1* mutant of *Schizosaccharomyces pombe*. *Appl Microbiol Biotechnol* 86, :263-272.

**Ono, T., Suzuki, T., Anraku, Y., and Iida, H.** (1994). The *MID2* gene encodes a putative integral membrane protein with a Ca (2+)-binding domain and shows mating pheromone-stimulated expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 151(1-2), 203-208.

**Orr-Weaver, T.K., Szostack, J.W., and Rothstein, R.J.** (1991). Genetic applications of yeast transformation with linear and gapped plasmid. *Meth Enzymol* 101, 228-245.



- Osumi, M., Sato, M., Ishijima, S.A., Konomi, M., Tanagi, T., and Yaguchi, H.** (1998). Dynamics of cell wall formation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Fungal Genetics and Biology* 24, 178-206.
- Osumi, M., Yamada, N., Kobori, H., Taki, A., Naito, N., Baba, M., and Nagatani, T.** (1989). Cell wall formation in regenerating protoplast of *Schizosaccharomyces pombe*: study by high resolution, low voltage scanning electron microscopy. *J Electron Microsc* 38, 457-468.
- Otilie, S., Miller, P.J., Johnson, D.I., Creasy, C.L., Sells, M.A., Bagrodia, S., Forsburg, S., and Chernoff, J.** (1995). Fission yeast *pak1*<sup>+</sup> encodes a protein kinase that interacts with Cdc42p and is involved in the control of cell polarity and mating. *EMBO J* 14, 5908-5919.
- Park, H.O., and Bi, E.** (2007). Central roles of small GTPases in the development of cell polarity in yeast and beyond. *Microbiol Mol Biol Rev* 71, 48-96.
- Pelham, R.J.J., and Chang, F.** (2001). Role of actin polymerization and actin cables in actin-patch movement in *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Cell Biol* 3, 235-244.
- Pelham, R.J., and Chang, F.** (2002). Actin dynamics at the contractile ring during cytokinesis in fission yeast. *Nature* 419, 82-86.
- Pérez, P., and Rincón, S.A.** (2010). Rho GTPases: regulation of cell polarity and growth in yeasts. *Biochem J* 426, 243-253.
- Philip, B., and Levin, D.E.** (2001). Wsc1 and Mid2 are cell surface sensors for cell wall integrity signalling that act through Rom2, a guanine nucleotide exchange factor for Rho1. *Mol Cell Biol* 21, 271-280.
- Pollard, T.D., and Wu, J.Q.** (2010). Understanding cytokinesis: lessons from fission yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11, 149-155.
- Pruyne, D., Legesse-Miller, A., Gao, L., Dong, Y., and Bretscher, A.** (2004). Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 559-591.
- Qadota, H., Python, C.P., Inoue, S.B., Arisawa, M., Anraku, Y., Zheng, Y., Watanabe, T., Levin, D.E., and Ohya, Y.** (1996). Identification of yeast Rho1p GTPase as a regulatory subunit of 1,3- $\beta$ -glucan synthase. *Science* 272, 279-281.
- Radding, J.A., Heidler, S.A., and Turner, W.W.** (1998). Photoaffinity analog of the semisynthetic echinocandin LY303366: identification of echinocandin targets in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother* 42, 1187-1194.
- Ragni, E., Fontaine, T., Gissi, C., Latgè, J.P., and Popolo, L.** (2007). The Gas family of proteins of *Saccharomyces cerevisiae*: characterization and evolutionary analysis. *Yeast* 24, 297-308.
- Rajavel, M., Philip, B., Buehrer, B.M., Errede, B., and Levin, D.E.** (1999). Mid2 is a putative sensor for cell integrity signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 19, 3969-3976.

**Reese, A.J., and Doering, T.L.** (2003). Cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan is required to anchor the *Cryptococcus neoformans* capsule. *Mol Microbiol* *50*, 1401-1409.

**Reid, T., Furiyashiki, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Watanabe, N., Fujisawa, K., Morii, N., Madaule, P., and Nayumira, S.** (1996). Rhotekin, a new putative target for Rho bearing homology to a serine/threonine kinase, PKN, and rhopilin in the rho-binding domain. *J Biol Chem* *271*, 13556-13560.

**Reinoso-Martín, C., Schüller, C., Schuetzer-Muehlbauer, M., and Kuchler, K.** (2003). The yeast protein kinase C cell integrity pathway mediates tolerance to the antifungal drug caspofungin through activation of Slp2p mitogen-activated protein kinase signaling. *Eukaryot Cell* *2*, 1200-1210.

**Ren, X.D., Kiesses, W.B., and Schwartz, M.A.** (1999). Regulation of the small GTP-binding protein Rho by cell adhesion and the cytoskeleton. *EMBO J* *18*, 578-585.

**Ribas, J.C., Díaz, M., Durán, A., and Pérez, P.** (1991). Isolation and characterization of *Schizosaccharomyces pombe* mutants defective in cell wall (1-3) $\beta$ -D-glucan. *J Bacteriol* *173*, 3456-3462.

**Rincón, S., Santos B., and Perez, P.** (2005). Fission yeast Rho5p GTPase is a functional paralogue of Rho1p that plays a role in survival of spores and stationary-phase cells. *Eukaryotic Cell* *5*, 435-446.

**Rincón, S.A., Ye, Y., Villar-**

**Tajadura, M.A., Santos, B., Martin, S.G., and Pérez, P.** (2009). Pob1 participates in the Cdc42 regulation of fission yeast actin cytoskeleton. *Mol Biol Cell* *20*, 4390-4399.

**Rodicio, R., Buchwald, U., Schmitz, H.P., and Heinisch, J.J.** (2008). Dissecting sensor functions in cell wall integrity signaling in *Kluyveromyces lactis*. *Fungal Genet Biol* *45*, 422-435.

**Rodicio, R., and Heinisch, J.J.** (2010). Together we are strong - cell wall integrity sensors in yeasts. *Yeast* *27*, 531-540.

**Roh, D.-H., Bowers, B., Riezman, H., and Cabib, E.** (2002). Rho1p mutations specific for regulation of  $\beta$ (1,3)glucan synthesis and the order of assembly of the yeast cell wall. *Mol Microbiol* *44*, 1167-1183.

**Roncero, C., and Sánchez, Y.** (2010). Cell separation and the maintenance of cell integrity during cytokinesis in yeast: the assembly of a septum. *Yeast* *27*, 521-530.

**Rothstein, R.J.** (1983). One-Step gene disruption in yeast. *Meth Enzymol* *101*, 202-211.

**Rothstein, R.** (1991). Targeting, disruption, replacement and allele rescue: Integrative DNA transformation in yeast. in Gurthrie, C and Fink, G R (Eds), *Methods in Enzymology: Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, Academic Press, 281-301.

**Rustici, G., Mata, J., Kivinen, K., Lió, P., Penkett, C.J., Burns, G., Hayles,**

- J., Brazma, A., Nurse, P., and Bähler, J.** (2004). Periodic gene expression program of the fission yeast cell cycle. *Nat Genet* 36, 809-817.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd edn (Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Sambrook, J., and Russell, D.W.** (2001). "Molecular cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R.** (1977). DNA sequencing with chain-termination inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74, 5463-5467.
- Santos, B., Gutiérrez, J., Calonge, T.M., and Pérez, P.** (2003). Novel Rho GTPase involved in cytokinesis and cell wall integrity in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Eukaryotic Cell* 2, 521-533.
- Santos, B., Martin-Cuadrado, A.B., Vazquez de Aldana, C.R., del Rey, F., and Perez, P.** (2005). Rho4 GTPase is involved in secretion of glucanases during fission yeast cytokinesis. *Eukaryotic Cell* 4, 1639-1645.
- Sawin, K.E., and Nurse, P.** (1998). Regulation of cell polarity by microtubules in fission yeast. *J Cell Biol* 142, 457-471.
- Sawin, K.E., and Tran, P.T.** (2006). Cytoplasmic microtubule organization in fission yeast. *Yeast* 23, 1001-1014.
- Sayers, L.G., Katayama, S., Nakano, K., Mellor, H., Mabuchi, I., Toda, T., and Parker, P.J.** (2000). Rho-dependence of *Schizosaccharomyces pombe* Pck2. *Genes Cells* 5, 17-27.
- Sekiya-Kawasaki, M., Abe, M., Saka, A., Watanabe, D., Kono, K., Minemura-Asakawa, M., Ishihara, S., Watanabe, T., and Ohya, Y.** (2002). Dissection of upstream regulatory components of the Rho1p effector, 1,3-beta-glucan synthase, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 162, 663-676.
- Sells, M.A., Barratt, J.T., Caviston, J., Otilie, S., Leberer, E., and Chernoff, J.** (1998). Characterization of Pak2p, a pleckstrin homology domain-containing, p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* 273, 18490-18498.
- Sengar, A.S., Markley, N.A., Marini, N.J., and Young, D.** (1997). Mkh1, a MEK kinase required for cell wall integrity and proper response to osmotic and temperature stress in *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Cell Biol* 17, 3508-3519.
- Shahinian, S., and Bussey, H.** (2000).  $\beta$ -1,6-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 35 (3), 477-489.
- Shaner, N.C., Steinbach, P.A., and Tsien, R.Y.** (2005). A guide to choosing fluorescent proteins. *Nature Methods* 2 905 - 909
- Shiozaki, K., and Russell, P.** (1995a). Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission

yeast. *EMBO J* 14, 492-502.

**Shiozaki, K., and Russell, P.** (1995b). Cell-cycle control linked to extracellular environment by MAP kinase pathway in fission yeast. *Nature* 378, 739-743.

**Sietsma, J.H., and Wessels, J.G.H.** (1977). Chemical analysis of the hyphal wall of *Schizophyllum commune*. *Biochim Biophys Acta* 496, 225-239.

**Sietsma, J.H., and Wessels, J.G.H.** (1990). The occurrence of glucosaminoglycan in the wall of *S. pombe*. *J Gen Microb* 136, 2261-2265.

**Sipiczki, M.** (1995). Phylogenesis of fission yeasts. Contradictions surrounding the origin of a century old genus. *Antonie Van Leeuwenhoek* 68, 119-149.

**Sipiczki, M.** (2007). Splitting of the fission yeast septum. *FEMS Yeast Res* 7, 761-770.

**Sirotkin, V., Beltzner, C.C., Marchand, J.-B., and Pollard, T.D.** (2005). Interactions of WASp, myosin-I, and verprolin with Arp2/3 complex during actin patch assembly in fission yeast. *J Cell Biol* 170, 637-648.

**Sirotkin, V., Berro, J., Macmillan, K., Zhao, L., and Pollard, T.D.** (2010). Quantitative Analysis of the Mechanism of Endocytic Actin Patch Assembly and Disassembly in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* *Epub ahead of print*.

**Soto, T., Villar-Tajadura, M.A., Madrid, M., Vicente, J., Gacto, M., Pérez,**

**P., and Cansado, J.** (2010). Rga4 modulates the activity of the fission yeast cell integrity MAPK pathway by acting as a Rho2 GTPase-activating protein. *J Biol Chem* 285, 11516-11525.

**Spector, I., Shochet, N.R., Blasberger, D., and Kashman, Y.** (1989). Latrunculins--novel marine macrolides that disrupt microfilament organization and affect cell growth: I. Comparison with cytochalasin D. *Cell Motil Cytoskeleton* 13(3), 127-144.

**Straede, A., and Heinisch, J.J.** (2007). Functional analyses of the extra- and intracellular domains of the yeast cell wall integrity sensors Mid2 and Wsc1. *FEBS Lett* 581, 4495-4500.

**Streiblova, E.** (1984). The yeast cell wall- A marker system for cell cycle controls. *The microbial cell cycle* (ed P Nurse and E Streiblova) CRC Press Boca Raton Florida, 89-107.

**Sugawara, T., Sato, M., Takagi, T., Kamasaki, T., Ohno, N., and M. Osumi** (2003). In situ localization of cell wall  $\alpha$ -1,3-glucan in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *J Electron Microsc* 52, 237-242.

**Sugawara, T., Takahashi, S., Osumi, M., and Ohno, N.** (2004). Refinement of the structures of cell-wall glucans of *Schizosaccharomyces pombe* by chemical modification and NMR spectroscopy. *Carbohydrate Research* 339, 2255-2265.

**Sugiura, R., Toda, T., Shuntoh, H., Yanagida, M., and Kuno, T.** (1998). *pmp1<sup>+</sup>*, a suppressor of calcineurin

deficiency, encodes a protein similar to the *cdc10+* and *SWI4* gene products. *EMBO J* 17, 140-148.

**Sugiura, R., T., T., Dhut, S., Shuntoh, H., and Kuno, T.** (1999). The MAPK kinase *Pek1* acts as a phosphorylation-dependent molecular switch. *Nature* 399, 479-483.

**Tabuchi, M., Tanaka, N., Iwahara, S., and Takegawa, K.** (1997b). The *Schizosaccharomyces pombe gms1<sup>+</sup>* gene encodes an UDP-galactose transporter homologue required for protein galactosylation. *Biochem Biophys Res Commun* 232, 121-125.

**Tajadura, V., Garcia, B., Garcia, I., Garcia, P., and Sanchez, Y.** (2004). *Schizosaccharomyces pombe* *Rgf3p* is a specific Rho1 GEF that regulates cell wall  $\beta$ -glucan biosynthesis through the GTPase Rho1p. *J Cell Sci* 117, 6163-6174.

**Takada, H., Nishimura, M., Asayama, Y., Mannse, Y., Ishiwata, S., Kita, A., Doi, A., Nishida, A., Kai, N., Moriuchi, S., et al.** (2007). *Atf1* Is a Target of the MAP Kinase *Pmk1* and Regulates Cell Integrity in Fission Yeast. *Mol Biol Cell* 18, 4794-4802.

**Takeda, T., Toda, T., Kominami, K., Kohnosu, A., Yanagida, M., and Jones, N.** (1995). *Schizosaccharomyces pombe atf1<sup>+</sup>* encodes a transcription factor required for sexual development and entry into stationary phase. *EMBO J* 14, 6193-6208.

**Tatebe, H., Nakano, K., Maximo, R., and Shiozaki, K.** (2008). *Pom1* DYRK

regulates localization of the *Rga4* GAP to ensure bipolar activation of *Cdc42* in fission yeast. *Curr Biol* 18, 322-330.

**Tatebe, H., Shimada, K., Uzawa, S., Morigasaki, S., and K., S.** (2005). *Wsh3/Tea4* is a novel cell-end factor essential for bipolar distribution of *Tea1* and protects cell polarity under environmental stress in *S. pombe*. *Curr Biol* 15, 1006-1015.

**Toda, T., Shimanuki, M., and Yanagida, M.** (1993). Two novel protein kinase C-related genes of fission yeast are essential for cell viability and implicated in cell shape control. *EMBO J* 12, 1987-1995.

**Tran, P.T., Marsh, L., Doyle, V., Inoue, S., and Chang, F.** (2001). A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based upon microtubule pushing. *J Cell Biol* 153, 397-411.

**Umeda, K., Yoko-o, T., Nakayama, K., Suzuki, T., and Jigami, Y.** (2000). *Schizosaccharomyces pombe gmd3(+)/alg11(+)* is a functional homologue of *Saccharomyces cerevisiae* *ALG11* which is involved in N-linked oligosaccharide synthesis. *Yeast* 16, 1261-1271.

**Vay, H.A., Philip, B., and Levin, D.E.** (2004). Mutational analysis of the cytoplasmic domain of the *Wsc1* cell wall stress sensor. *Microbiology* 150, 3281-3288.

**Verde, F., Mata, J., and Nurse, P.** (1995). Fission yeast cell morphogenesis: identification of new genes and analysis of their role during the cell cycle. *J Cell Biol* 131, 1529-1538.

**Verna, J., Lodder, A., Lee, K., Vagts, A., and Ballester, R.** (1997). A family of genes required for maintenance of cell wall integrity and for the stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* *94*, 13804-13809.

**Verstrepen, K.J., and Klis, F.M.** (2006). Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* *60*, 5-15.

**Vilella, F., Herrero, E., Torres, J., and de la Torre-Ruiz, M.A.** (2005). Pkc1 and the Upstream Elements of the Cell Integrity Pathway in *Saccharomyces cerevisiae*, Rom2 and Mtl1, Are Required for Cellular Responses to Oxidative Stress. *J Biol Chem* *280*, 9149-9159.

**Villar-Tajadura, M.A., Coll, P.M., Madrid, M., Cansado, J., Santos, B., and P., P.** (2008). Rga2 is a Rho2 GAP that regulates morphogenesis and cell integrity in *S. pombe*. *Mol Microbiol* *70*, 867-881.

**Vink, E., Rodriguez-Suarez, R.J., Gérard-Vincent, M., Ribas, J.C., de Nobel, H., van den Ende, H., Durán, A., Klis, F.M., and Bussey, H.** (2004). An in vitro assay for (1 → 6)-beta-D-glucan synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *21*, 1121-1131.

**Wagner, C., Graniger, W., Presterl, E., and Joukhadar, C.** (2006). The echinocandins: comparison of their pharmacokinetics, pharmacodynamics and clinical applications. *Pharmacology* *78*, 161-177.

**Wang, H., Tang, X., and Balasubramanian, M.K.** (2003). Rho3p

regulates cell separation by modulating exocyst function in *Schizosaccharomyces pombe*. *Genetics* *164*, 1323-1331.

**Willer, T., Brandl, M., Sipiczki, M., and Strahl, S.** (2005). Protein O-mannosylation is crucial for cell wall integrity, septation and viability in fission yeast. *Mol Microbiol* *57*, 156-170.

**Win, T.Z., Gachet, Y., Mulvihill, D.P., May, K.M., and Hyams, J.S.** (2001). Two type V myosins with non-overlapping functions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Myo52 is concerned with growth polarity and cytokinesis, Myo 51 is a component of the cytokinetic actin ring. *J Cell Sci* *114*, 69-79.

**Wood, V., Gwilliam, R., Rajandream, M.A., Lyne, M., Lyne, R., Stewart, A., Sgouros, J., Peat, N., Hayles, J., Baker, S., et al.** (2002). The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* *415*, 871-880.

**Yang, P., Kansra, S., Pimental, R.A., Gilbreth, M., and Marcus, S.** (1998). Cloning and characterization of *shk2*, a gene encoding a novel p21-activated protein kinase from fission yeast. *J Biol Chem* *273*, 18481-18489.

**Yang, P., Qyang, Y., Bartholomeusz, G., Zhou, Z., and Marcus, S.** (2003). The novel Rho1 GTPase-activating protein family, Rga8, provides a potential link between cdc42/p21-activated kinase and Rho signaling pathways in the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* *278*, 48821-48830.



**Yoshida, S., Kono, K., Lowery, D., Bartolini, S., Yaffe, M., Ohya, Y., and Pellman, D.** (2006). Polo-like kinase Cdc5 controls the local activation of Rho1 to promote cytokinesis. *Science* 313, 108-111.

**Yoshida, S., Bartolini, S., and D., P.** (2009). Mechanisms for concentrating Rho1 during cytokinesis. *Genes Dev* 23, 810-823.

**Zaitsevskaya-Carter, T., and Cooper, J.A.** (1997). Spm1, a stress-activated MAP kinase that regulates morphogenesis in *S. pombe*. *EMBO Journal* 16, 1318-1331.

**Zhou, C., Yang, Y., and Ambrose, Y.J.** (1990). Mini-prep in ten minutes. *Biotechniques* 8, 712-713.

**Ziegler, F.D., Gemmill, T.R., and Trimble, R.B.** (1994). Glycoprotein synthesis in yeast. Early events in N-linked oligosaccharide processing in *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 269, 12527-12535.